

東京農工大学大学院

連合農学研究科

生物生産学専攻

小林俊一

本論文は、栃木県農業試験場に在職する著者が、大学院設置基準第 14 条に基づく教育方法の特例を受けて行った博士課程での成果をそれまでの研究結果も含めてとりまとめたものであり、以下に発表した。

1. 小林俊一・吉田智彦 2005. RAPD 分析による栃木県水稻優良品種の品種識別. 日本作物学会紀事 74:207 – 211.
2. 小林俊一・吉田智彦 2006. RAPD 分析による栃木県を中心とした関東周辺地域のムギ類優良品種識別. 日本作物学会紀事 75:165 – 174.
3. 小林俊一・吉田智彦 2006. 関東周辺地域のムギ類優良品種における近縁係数と分子マーカーから推定した遺伝的距離との関係. 日本作物学会紀事 75:175 – 181.
4. 小林俊一・吉田智彦 2007. RAPD 分析によるユウガオ (*Lagenaria siceraria*) の品種分類. 日本作物学会紀事 76:96 – 99.

## 目 次

総合要旨	1
要旨	2
第1章 序論	5
第2章 RAPD 分析による栃木県水稻優良品種の品種識別	11
第3章 RAPD 分析による栃木県を中心とした関東周辺地域のムギ類優良品種識別	23
1. コムギの優良品種識別	23
2. オオムギの優良品種識別	33
3. コムギ優良品種のクラスター分析による分類	40
4. オオムギ優良品種のクラスター分析による分類	45
第4章 コムギおよびオオムギにおける近縁係数と遺伝的距離との関係	49
1. コムギの近縁係数と遺伝的距離との関係	50
2. オオムギの近縁係数と遺伝的距離との関係	59
第5章 RAPD 分析によるユウガオ ( <i>Lagenaria siceraria</i> ) の品種分類	70
1. RAPD 分析による品種分類	73
2. ユウガオのクラスター分析による分類	81
第6章 総合考察	86
謝辞	92
引用文献	93
Summary	98

## 総 合 要 旨

栃木県産米の品質向上と原種，および原々種の混種防止を目的として，栃木県奨励品種を中心に酒米品種を含む合計 20 品種について，RAPD 分析により 9 種類の DNA マーカーを用いた品種識別技術を確立した。

同様にして，栃木県の奨励品種および有望視している品種を中心に関東周辺地域に作付けされているコムギ 17 品種を RAPD 分析による 6 種類の DNA マーカーで，二条・六条・裸オオムギを含むオオムギ 19 品種については 9 種類の DNA マーカーで，識別する技術を開発した。1945 年育成の古い品種である小麦農林 61 号は原種の採種地により多型が認められた。近年育成の水稻や二条オオムギ品種では，同一品種内に多型は検出されなかった。これらのデータを用いクラスター分析を行った結果，コムギ，オオムギともに大きく 2 つのクラスターに明確に分類できた。

ムギ類品種を用い，交配記録の系譜から統計的に近縁係数を算出した。次にこれらの品種間で RAPD 分析による同一のバンドを示す DNA マーカー数と根井の遺伝的距離  $D$  を算出した。コムギ，オオムギともにこれらの間の相関は高く，いずれも血縁関係の推定や遺伝的な多様性を維持しつつ品種育成をするための情報として有効と考えられた。

他殖性であるユウガオの保存品種について維持保存のため，ユウガオ 14 品種とヒョウタン 10 品種，合計 24 品種について RAPD 分析を行ったところ，同一品種内での変異もみられたが，品種間の分類が可能であった。クラスター分析によると，栃木県由来の品種間では近縁関係が極めて近く，県外や海外からの導入品種は近縁関係が遠いことが示唆された。保存品種を維持するにあたり，県内品種については表現型で分類し代表的な品種を，導入品種については広い地域からの品種を数多く保存することが望ましいと提言できた。

## 要 旨

1. 栃木県産米の品質向上と原種，および原々種の混種防止を目的として，栃木県奨励品種を中心に，栃木県育成の有望品種栃木 7 号，および栃木酒 14 号等，合計 20 品種について，安価で簡易な RAPD 分析のみによる品種識別技術を確立した．これらの品種識別は 7 種類のランダムプライマーを用いて DNA を増幅した後，1.5 %アガロースゲルで電気泳動を行い，エチジウムブロマイド溶液で染色後に現れた 9 種類の DNA マーカーの多型を比較することで可能であった．

2. 関東周辺地域に作付けされているコムギ主要 17 品種について RAPD 分析による品種識別技術を開発した．5 種類のランダムプライマーを用いて DNA を増幅した後，1.5 %アガロースゲルで電気泳動しエチジウムブロマイド溶液で染色し，現れた 6 種類の DNA マーカーの多型を確認することで識別が可能であった．

3. 栃木県の奨励品種を中心に二条・六条・裸オオムギを含むオオムギ主要 19 品種について RAPD 分析による品種識別技術を開発した．6 種類のランダムプライマーで現れた 9 種類の DNA マーカーの多型を確認することで識別が可能であった．

4. 1945 年育成の古い品種である小麦農林 61 号は原種の採種地によりわずかに DNA 多型が認められた．近年育成の水稻栃木 7 号や二条オオムギ関東二条 35 号の系統間に DNA 多型は認められず，固定しているものと考えられた．

5. DNA マーカーの多型を用いたクラスター分析の結果，コムギでは小麦農林 61 号を含むクラスターとそれ以外のクラスターの 2 つに，オオムギでは二条オオムギと六条オ

オムギとの 2 つのクラスターに明確に分類できた．用途や育成地毎に特徴があり，まだ遺伝的多様性が残されていると推定された．

6．品種間の遺伝的背景を把握する目的で，関東周辺地域のコムギ品種を用い，交配記録の系譜から統計的に近縁係数を算出した．また，RAPD 分析による同一のバンドを示す DNA マーカー数と根井の遺伝的距離  $D$  を算出した．同一のマーカー数と近縁係数の間の相関係数は  $0.581 \sim 0.904$ ，遺伝的距離と近縁係数の間の相関係数は  $-0.511 \sim -0.892$  であった．

7．同様にオオムギ品種では，同一のマーカー数と近縁係数の間の相関係数は  $0.731 \sim 0.805$ ，遺伝的距離と近縁係数の間の相関係数は  $-0.659 \sim -0.770$  であった．

8．コムギ，オオムギにおいて今回の分子マーカーから得た遺伝情報は，育成の過程で後代にほぼ均等に分離していったことを示すと考えられた．また，このことは，これら品種の系譜の記録は極めて正確であることを示す一方，系譜に不整合の可能性のある品種を示唆することができた．遺伝情報を利用した DNA マーカーおよび近縁係数による簡易な血縁関係の推定は利用価値が高いと考えられる．なお，同一マーカー数と遺伝的距離の相関係数は極めて高かった．遺伝的な多様性の維持を意識しながら品種育成するためにもこれらの情報の有効利用が必要と考えられた．

9．他殖性であるユウガオの保存品種について，維持保存のため，栃木県育成品種 5 品種を含むユウガオ 14 品種とヒョウタン 10 品種，合計 24 品種について RAPD 分析を用いて分類を試みた．44 種類のランダムプライマーを用いて 31 種類の DNA マーカーが得られた．栃木県由来の品種間では 4 種類の多型がみられたのみであり，近縁関係が極めて近いと示唆された．同一品種内の個体間で多型がみられた場合もあるが，品種間の分類

が可能であった。

10. ユウガオのクラスター分析の結果から、県外や海外からの導入品種は近縁関係が遠いことが示唆された。これらのことから、今後も保存品種を維持するにあたり、県内品種については表現型で分類し代表的な品種を、導入品種については広い地域からの品種を数多く保存することが望ましいとの提言が可能であった。

11. このようにして、本研究では他の DNA マーカーより安価で簡易な RAPD 分析による自殖、他殖性作物の品種識別方法を開発した。また、コムギ、オオムギでは品種間の近縁係数が遺伝的距離と有意な相関があることを明らかにした。さらに、より簡易な近縁関係を推定する方法として DNA 多型から算出した同一マーカー数が有効であることを明らかにした。ユウガオでは RAPD 分析により栃木県由来の品種間では近縁関係が極めて近いことを明らかにした。これらの成果は本県育成品種の権利保護と品質向上並びに原種、および原々種の混種防止、さらには二条オオムギの新品種育成技術とユウガオの品種保存に大きく寄与するものと考えられる。

## 第1章 序論

栃木県における水稻の生産は、2003 年度で作付面積が約 65300ha、作況指数は 92 であったものの収穫量は 316700t あり、本県農業産出額の 1 / 3 を占める基幹作物となっている（栃木県農務部 2004a）。品種の構成は良食味であるコシヒカリが約 8 割、次いで県南を中心に縞葉枯病抵抗性の月の光が 7 %、ひとめぼれ・あさひの夢がそれぞれ約 4 %となっている。栃木県農業試験場では 1987 年から水稻品種の育種を開始し、1995 年には県南地域向きの縞葉枯病抵抗性で良食味の品種、晴れすがたを育成した（大谷ら 1996）。また、2004 年 2 月に早生で良食味な栃木 7 号（後のなすひかり）を、10 月には酒造好適米の栃木酒 14 号（後のとちぎ酒 14）を品種登録出願した。

一方で、近年消費者の安全性に対する関心や健康志向の高まりにより、農林物資の規格化および品質表示の適正化に関する法律が改正される（改正 JAS 法）とともに、農林水産大臣が制定した品質表示基準に従った表示を義務付ける品質表示基準制度が充実・強化された。さらに、栃木県の種子更新率は 2002 年産では 63 %と米の主産県としては低く、この向上が流通業者から求められており、県としては種子更新率 100 %を目標に掲げている（栃木県農務部 2004a）。しかし、これら品種数の増加や種子更新率の向上は原々種や原種生産において作業の煩雑さの増加を伴い、混種・取り違えの危険性が高まる。従来、品種の識別は形態や生理特性等で行ってきたが、この方法では気象条件や栽培方法等が結果を大きく左右し、識別が困難となる場合がある。これらの影響を受けない DNA マーカーの利用は品種識別にとって極めて有効である。

イネの品種識別のための DNA マーカーの開発は大坪ら（1997）が Random Amplified Polymorphic DNA（RAPD）分析を用いて国内作付け上位 10 品種を識別した。その後、赤木（2000）は Simple Sequence Repeats（SSR）分析が近縁品種の識別に有効であるとしている。大坪ら（2002）は RAPD 分析によって得られた品種識別に好適なバンドを Sequence Tagged-Site（STS）化し、それらのプライマーをマルチプレックス化して使用



することにより，日本の代表的な 50 品種を識別できるプライマーセットを開発した．これらのプライマーセットは極めて有用であるが，栃木県で開発した品種への適用性については検討されていない．

栃木県のムギ類生産は，2000 年産から増加しており，2003 年産の作付面積は作付けの無い裸ムギを除いた 3 麦計で 15800ha，収穫量は 62000t であり，ムギ類は本県農業の重要な土地利用型作物となっている．麦種別に見ると，コムギでは 1997 年には作付面積が 2130ha，収穫量が 8690t であったが，2003 年には作付面積が 2540ha，収穫量が 9860t に増加した．六条オオムギは主に主食や麦茶用であり，1995 年には作付面積がわずかに 61ha，収穫量が 261t であったが，2003 年には作付面積が 2370ha，収穫量が 10100t まで増加した．二条オオムギは主にビール醸造用であり，1999 年に作付面積が 9320ha，収穫量が 33400t まで落ち込んだが，2003 年には 10900ha，42000t まで回復した．このように，減少傾向であったムギ類の生産は，生産者と実需者が共存共栄し，国民の理解が得られるような麦作振興方策と麦関連産業の発展の方向を見出し，消費者ニーズに適切に対応していくことが必要であるとして，「新たな麦政策大綱」（1998 年 5 月省議決定）が策定されたことにより，順調に生産振興が図られているように見える．しかし，2000 年から進められてきた民間流通の影響から，産地間の品質評価に格差が広がっている．また，全国的な生産増加の反面，品種や品質は必ずしも実需者側からの要望に答えられていないことから，その解消が大きな課題となっており，現在，大綱に掲げられている民間流通の仕組み，銘柄やランク区分等の見直しが検討されている（栃木県農務部 2003，2004b）．

以上の情勢に対応するため，栃木県では需要動向に応じた作付誘導，品質向上対策および優良品種の導入を図っている．コムギでは，イワイノダイチを 2000 年に，タマイズミを 2002 年に奨励品種として採用した．さらに，地産地消の推進の影響を受け，製パン用のニシノカオリの導入を検討中である．六条オオムギでは 1995 年にシュンライを奨励品種に採用し，大幅に作付けが拡大した．しかし，近年，硬質粒等の問題や，より加工適性の優れるファイバースノウが他県で採用されていることから，2005 年産から東山皮 101

号（後のシルキースノウ）を新たに奨励品種に採用した。醸造用二条オオムギについては、2000 年にスカイゴールデンを奨励品種に採用した（谷口ら 2001）。さらに醸造適性の高い関東二条 35 号（後のサチホゴールデン）を検討中である。このような品種のめまぐるしい変化および用途の多様化は栃木県のみならず、他県でも同様である。

これらの状況は、水稻と同様に原々種や原種生産において作業の煩雑さの増加を伴い混種および取り違えの危険性を高めている。また、用途の多様化により、品種の加工適性が大きく異なることから流通過程での取り違えもいままですら大きな問題となる。特に、コムギにおいてはいままではオーストラリア産スタンダードホワイト（ASW）に近い製麺適性を持つ品種を中心に選定してきたが、麺の食感の優れる低アミロース品種や、また硬質である醤油醸造用および製パン用コムギ品種が採用されてきている。これらの情勢から、今後、ムギ類の簡便で正確な品種識別技術に対する要望は高まってくると考えられる。国においても、2005 年度の「農林水産研究基本計画」では、農林水産物・食品の信頼確保に資する技術の開発の一つに生産地・品種・生産方法等を含む表示事項の真偽判別技術の開発を掲げ、2010 年度の期別達成目標として DNA マーカーによる品種または種子の簡易迅速判別技術を確立するとしている。

しかし、国内ムギ類品種の DNA マーカーを利用した品種識別については、Turuspekova ら（2001）が主要精麦用オオムギで SSR 分析を、内村ら（2004a）が二条オオムギで Cleaved Amplified Polymorphic Sequence（CAPS）分析を行っているに過ぎない。コムギでは内村ら（注：平成 12 年度福岡県農業総合試験場成果情報）が福岡県内の主要 4 品種について RAPD 分析で実施しているのみである。

以上の事を踏まえ、DNA マーカーの中で最も検出操作が簡便な RAPD 分析を用い、水稻では栃木県周辺地域の奨励品種である優良粳品種、および奨励品種ではないが県の事業等で栽培されていた酒造好適米品種、並びに栃木県農業試験場育成中の有望な系統の識別を試みた。

ムギ類では、栃木県の奨励品種を中心として関東周辺地域の奨励品種並びに栃木県農業

試験場で有望視している系統を識別できる RAPD マーカーの組み合わせを明らかにしようとした。また、近年の育成品種は民間流通の仕組みや銘柄、ランク区分等により、実需者の要望に応えられるよう高品質が求められ、育種目標は一定の収量や栽培特性を保持しつつも加工適性等、品質の向上が中心となっている。そのため、母本として自ずと高品質の品種や系統が組み合わされ、交配母本の系譜が似通ってきており、近縁度が高まっていると推定される。この近縁度の高まりは、今後、品種識別マーカーを開発していくうえでの支障となることが考えられる。奨励品種の選定でも近縁の品種が増加し特性が似通ってくると、新たな品種の採用が難しくなる。育種においても、交配計画を策定する際に交配親となる品種や系統間の遺伝的背景を解析し把握しておくことは効率的な品種育成や遺伝的多様性の維持のために重要となってくる。

そこで、品種間の遺伝的関係を探るため、交配親となる品種間の近縁係数や遺伝的距離の解析を試みた。近縁係数は、品種の系譜図を基にして共通な祖先品種から統計的に算出する手法である。遺伝的距離は、分子マーカー等を指標とした集団間の差から多次元空間における距離を求め、遺伝的相似度を算出する方法である。Smile ら（2002）はコムギを用いて遺伝的距離と品種の系譜図からみた祖先の共通な割合とを比較し、良く一致したと報告している。また、内村ら（2004b）は国内の二条オオムギ 22 品種を用い、近縁係数と分子マーカーにより算出した遺伝的距離との関係を解析し、これらの関係に有意な相関を認めている。

そこで、コムギおよびオオムギについて、育種の効率化のために遺伝的背景を把握する方法として次に述べる手法の有用性について検討した。

栃木県を中心とした関東周辺地域におけるムギ類の品種について、近縁係数を算出し、次に、簡単に品種間での違いを把握するため、品種間で同一のバンドを示した DNA マーカー数（以下、同一マーカー数と記す）を計算した。さらに品種間のマーカーの多型から根井の遺伝的距離  $D$ （根井 2002）（以下、遺伝的距離  $D$  と記す）を算出した。これら、同一マーカー数と遺伝的距離  $D$  で近縁係数がどの程度説明できるかも検討した。

栃木県の特用作物には、かんぴょう、こんにゃく、たばこ、あさなどが挙げられる。これらの作物は作付面積、収穫量ともに減少の一途にあるが、こんにゃくとかんぴょうは比較的、栽培面積が維持されている。かんぴょうはユウガオの果肉を細長くむき、干して鮓や煮物の具にする栃木県特産品の一つであり、原料となるユウガオは栃木県の特産作物の一つである。その歴史は古く諸説があるが、1712 年に江州（滋賀県）水口の城主であった鳥居伊賀守忠英が、下野国の壬生城に封ぜられてから栽培されるようになったというのが通説である（農山漁村文化協会 1989）。近年では、1978 年の 3040ha をピークとして、生産者の高齢化、輸入量の増大、食生活の変化による消費の減少等により減少し 1999 年には 349ha となったものの（栃木県 2001）、全国生産のほとんどを占めている（栃木県 2006）。

栃木県ではかんぴょうは重要な特産品であることから、1928 年頃からユウガオの品種育成が開始された。育種方法は在来優良品種を県内から収集し、これらからの純系分離が主であった。戦後もこの方法により育種を継続し、1956 年に品種しもつけしろ、しもつけあおを育成した。1959 年以降は耐病性品種育成を目的に東南アジアを中心に広くユウガオ属を収集し、遠縁交雑を行った。その後は交雑育種が中心となり、しもつけ晩生（小熊・藤平 1979）、ゆう太（高野ら 1992）を育成した。しかし、生産の急激な減少によりユウガオの品種育成は縮小の方向にある。現在、育成を担当している栃木分場では、育成品種、在来種その他、日本国内を始め海外から収集した 150 を超える品種等を維持・保存している。しかし、ユウガオは他殖性でもあり遺伝的に雑駁であること、研究者の不足、労力や予算の縮小などにともない、その品種維持は大きな負担となってきた。

ウリ科のユウガオ属に属しているユウガオを、牧野（1989）はユウガオ（*Lagenaria siceraria* (Molina) Standley var. *hispida* (Thunb. ex Murray) Hara), その変種であるヒョウタン（*L. siceraria* (Molina) Standley var. *gourda* (Ser.) Hara), フクベ（*L. siceraria* (Molina) Standley var. *depressa* (Ser.) Hara）に分類している。さらに、フクベは栃木県で栽培されており、かんぴょうと呼ばれていると記載している。しかし現在

では、ユウガオの果皮の部分を乾燥させたものを材料とし、彩色して作る工芸品をフクベ細工と呼び、それ以外ではフクベと表現する例はほとんど無く、我が国で唯一品種育成を実施している栃木県農業試験場栃木分場においてもユウガオ (*L. siceraria* var. *hispida*) とヒョウタン (*L. siceraria* var. *gourda*) の2つに分類している。

一方、分子生物学の急激な進歩にともない、DNA マーカーを利用した品種識別が盛んに行われているが、ユウガオについて DNA マーカーにより分類した例はまだ無く、Decker-Walters ら (2001) が世界各国のヒョウタン (*L. siceraria*; Cucurbitaceae) の在来種と品種について RAPD マーカーを用いて多様性の評価をしているのみである。

本論文では、ユウガオおよびヒョウタン品種を維持保存する際の参考とするため、その一部について RAPD マーカーを用いて多型を検出しようとした。また、そのデータをもとに品種を分類するため、ユークリッド距離を用いたクラスター分析を試みた。

以上のように、本研究では RAPD 分析による自殖性作物である水稻、ムギ類の品種識別方法と他殖性である栃木県の地域特産作物であるユウガオとヒョウタンの品種分類方法を開発しようとした。また、コムギ、オオムギでは品種間の近縁係数と遺伝的距離との関係を明らかにしようとした。さらに、より簡易な近縁関係を推定する方法として DNA 多型から算出した同一マーカー数の有効性を明らかにしようとした。ユウガオでは RAPD 分析により栃木県由来の品種間の関係を明らかにしようとした。これらの知見は本県育成品種の権利保護と品質向上並びに原種、および原々種の混種防止、さらには二条オオムギの新品種育成技術とユウガオの品種保存に大きく寄与するものであろう。

## 第2章 RAPD分析による栃木県水稻優良品種の品種識別

栃木県における水稻の品種構成は良食味であるコシヒカリが約8割、次いで月の光が7%、ひとめぼれ・あさひの夢がそれぞれ約4%となっている。

近年、適切な表示を義務付ける品質表示基準制度の充実・強化により、これら米品種のDNA鑑定が強く要望されている。

イネの品種識別のためのDNAマーカーの開発は大坪ら(1997)がRAPD分析を、赤木(2000)はSSR分析を行っている。河野ら(2000)はRestriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)分析, RAPD分析, SSR分析, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)分析について日本型品種の多型検出頻度を比較している。多型検出頻度はSSR分析, RFLP分析で高く、これらの組み合わせが連鎖解析手法には有効で、日本型品種識別には検出操作の容易なSSR分析やRAPD分析が有用で特にAFLP分析が適しているとしている。さらに、大坪ら(2002)はRAPD分析によって得られた品種識別に好適なバンドをSTS化し、それらのプライマーをマルチプレックス化した。同様なSTSプライマーを利用して秋田県においても秋田県の奨励品種を識別している(小笠原・高橋 2000)。これらのプライマーセットは極めて有用であるが、本県で開発した品種への適用性については検討されていない。

以上の事を踏まえ、本章ではDNAマーカーの中で最も検出操作の簡便であるRAPD分析を用い、栃木県の奨励品種を含め隣県の奨励品種であり県内で栽培されていると思われる優良粳品種、奨励品種にはなっていないが県の事業等で栽培されていた酒造好適米品種並びに栃木県農業試験場育成で有望である品種を識別できるDNAマーカーの組み合わせを明らかにしようとした。

### 材料と方法

#### (1) 供試品種

供試品種は粳品種では品種登録申請中の雑種代 15 代である栃木 7 号の 5 系統，栃木県奨励品種のひとつめぼれ，晴れすがた，コシヒカリ，アキニシキ，月の光，あさひの夢，有望系統である栃木 13 号・15 号，茨城県の奨励品種であるキヌヒカリ，ゆめひたち，日本晴，群馬県のゴロピカリ，朝の光，酒造好適米では品種登録に向けて検討している栃木酒 14 号，産地品種銘柄となっており実際に作付されている五百万石，試作されていたひとごこち，美山錦，若水と参考として山田錦の合計 20 品種である．ゴロピカリは群馬県産原種を，その他の品種は栃木県農業試験場の奨励品種決定調査に供試した種子，または，栃木県農業試験場で維持保存していたものを用いた．

## **(2) DNA の抽出**

DNA の抽出はポットに栽培したイネの生葉身から PhytoPure DNA 抽出キット (Amersham 社)，MagExtractor Plant Genome DNA 抽出キット (東洋紡績株式会社) およびスモールスケール CTAB 法 (Murray and Thompson 1980) の 3 種類の方法を用いて試みた．

## **(3) PCR 条件の検討**

始めに適正なアニーリング温度の検討を行った．コシヒカリの DNA 10ng /  $\mu$  L を鋳型とし，PCR 反応液はランダムプライマー OPB18 (オペロン社) 7.8  $\mu$  M を 0.8  $\mu$  L，dNTP 混合液 2.5 mM (タカラバイオ社) を 1  $\mu$  L，反応バッファー (タカラバイオ社) を 1.25  $\mu$  L および rTaq (タカラバイオ社) 0.5 unit に滅菌蒸留水を加え 12  $\mu$  L とした．PCR 条件は，サーマルサイクラー DNA Engine Tetrad PTC - 225 (MJ Japan 社) を用い，熱変性を 94  $^{\circ}$ C で 3 分後，94  $^{\circ}$ C で 1 分間，アニーリングを 1 分間，72  $^{\circ}$ C で 2 分間を 1 サイクルとして 40 サイクル行い，伸長反応を 72  $^{\circ}$ C で 2 分間行った．アニーリングは 35  $^{\circ}$ C から 46  $^{\circ}$ C 間で温度勾配を付けて検討した．増幅した DNA は 1.5 % アガロースゲルを用い 100 V の電圧で約 90 分間の電気泳動を行った．電気泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイド溶液で 30 分間染色後，デンストグラフ AE - 6920 - FX (アトー社) により DNA 増幅産物の確認を行った．

次に、鋳型 DNA の適正な濃度を検討した。栃木 7 号 1 系統の DNA を鋳型とし、濃度を 50, 25, 20, 10, 5ng /  $\mu$  L とした。ランダムプライマーは OPB18, OPM2, OPM11 (オペロン社) を使用した。PCR 反応液および条件は前述と同様とし、アニーリング温度は 44 °C とした。その後の処理も同様に行い、PCR 増幅産物の確認を行った。

#### **(4) RAPD 法による品種識別**

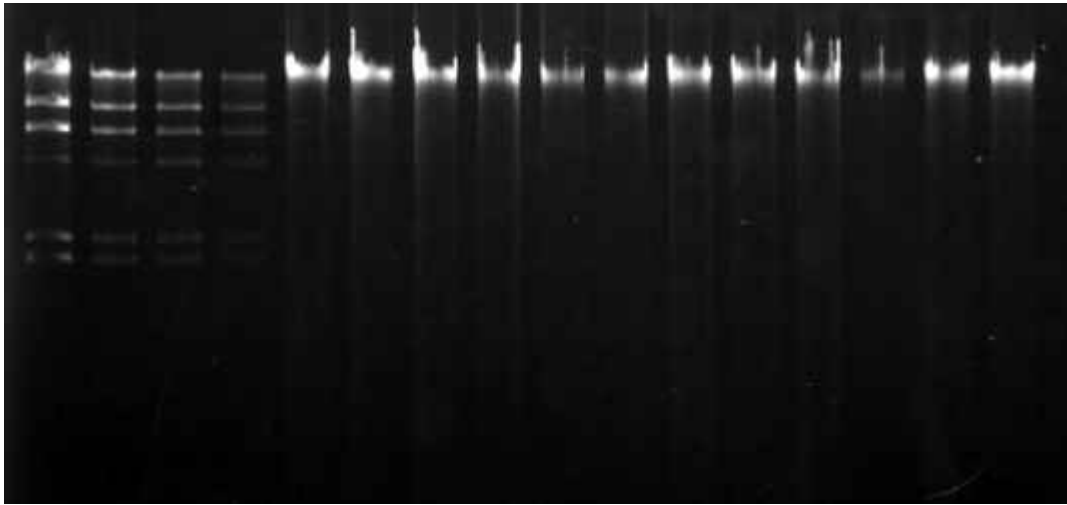
プライマーは大坪ら (1997) , 吉橋ら (1999) および滋賀県の成績等 (森ら 2001) を参考に多型の見られた 23 プライマーを選定した。20 プライマーは 10 量体 (オペロン社) , 3 プライマーは 12 量体 (日本ジーン社) である。PCR 条件は前述の結果から得られた最も有効な条件で行った。その後の処理は前述と同様に電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、デンシトグラフ AE - 6920 - FX (アトー社) により PCR 増幅産物の確認を行った。PCR 増幅バンドの有無による DNA 多型を検出して品種識別を行った。

## **結 果**

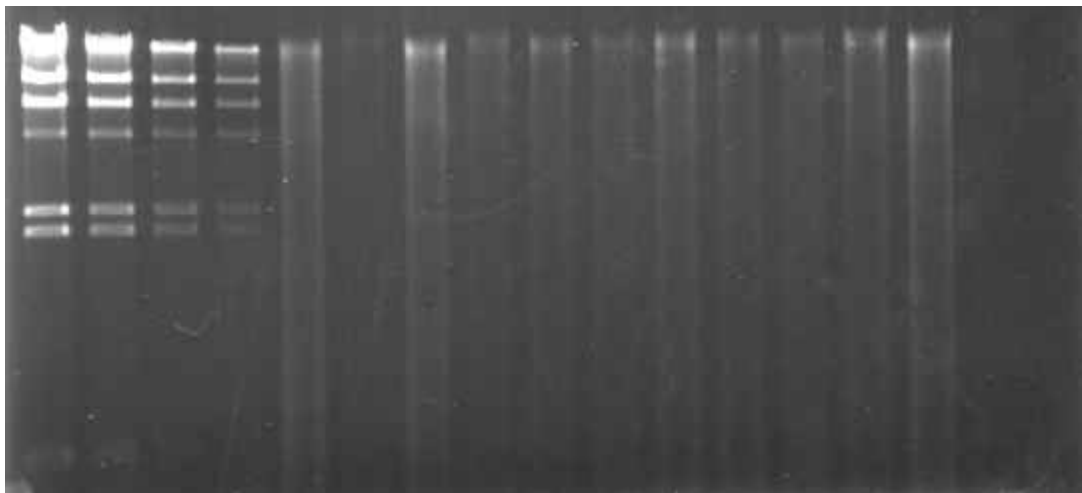
3 種類の DNA 抽出法を比較すると、電気泳動の結果から MagExtractor -Plant Genome- DNA 抽出キットを用いて抽出した DNA が収量が多く純度も高かった (第 1 図, PhytoPure DNA 抽出キットのデータ略)。そこで、Extractor -Plant Genome- DNA 抽出キットの説明書にそって前処理を行い、同社製自動核酸抽出装置 (MFX-2000) を用いて抽出を行った。

次いで、適正な PCR 条件を検討した。サーマルサイクラーのグラジエント機能を使用し、アニーリング温度を 35 °C から 46 °C まで温度勾配をつけた。温度は 35.0, 35.3, 35.9, 36.8, 38.1, 39.7, 41.6, 43.1, 44.3, 45.1, 45.8, 46.0 °C となった。その温度条件で増幅した DNA 増幅産物を電気泳動した結果を第 2 図に示した。35.0 °C では 1000bp 以上にミスマッチと思われる薄いバンドが幾つか見られる。これらのバンドは温度が高くなるにつれて薄くなり、39.7 °C でほとんど見えなくなった。逆に 41.6 °C から 900bp 付近と





MagExtractor Plant Genome DNA 抽出キットを用いて抽出した DNA.

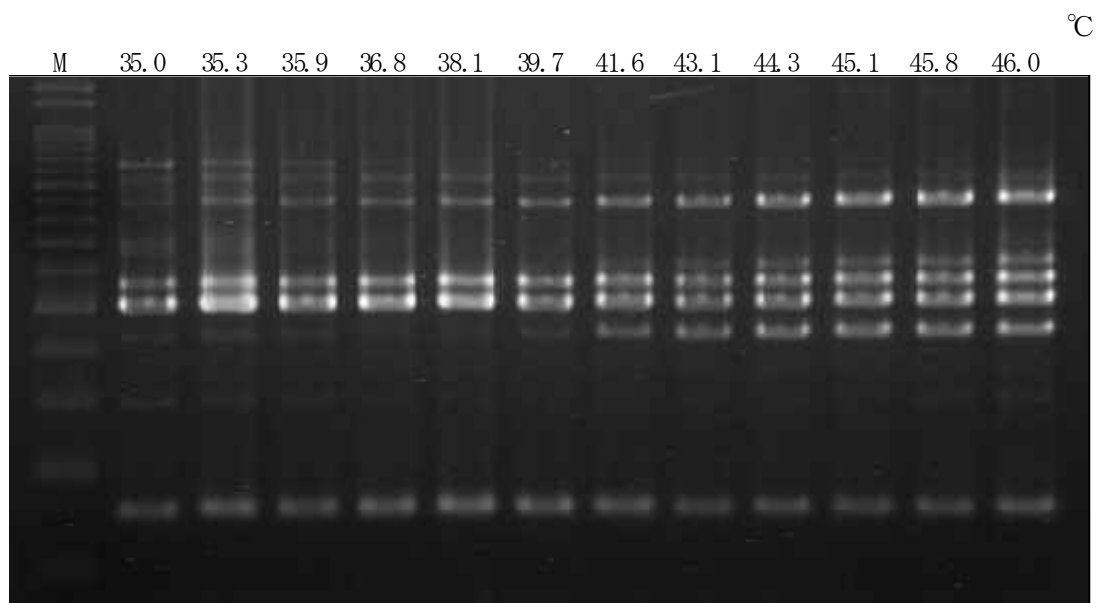


スモールスケール CTAB 法 (Murray and Thompson 1980)を用いて抽出した DNA.

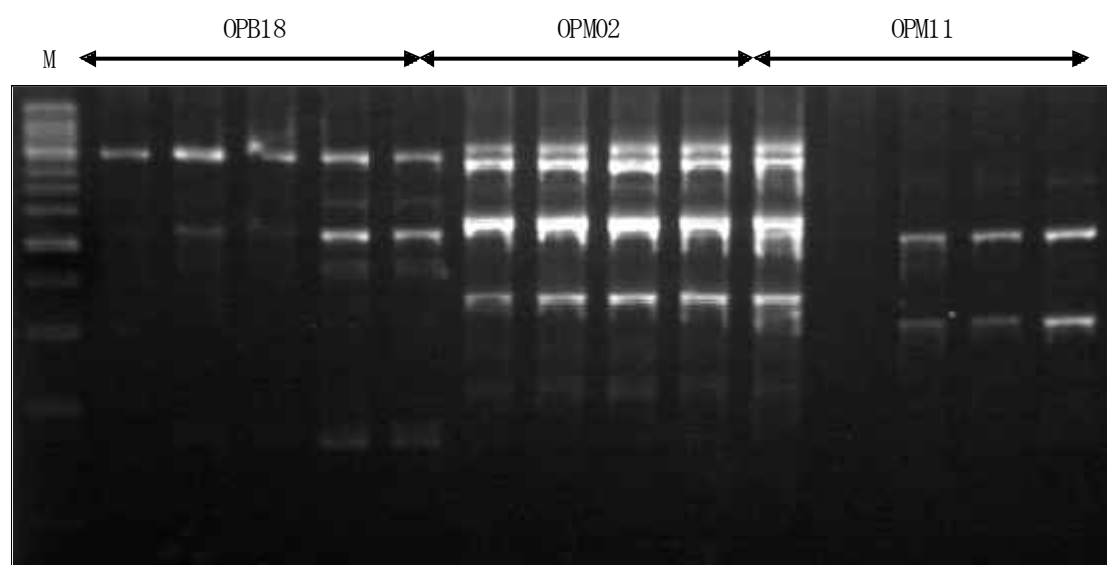
#### 第1図 水稻の生葉身から異なる方法で抽出した DNA.

レーンは左から 1.  $\lambda$  Him III : 200ng/ $\mu$  L, 2.  $\lambda$  Him III : 100ng/ $\mu$  L, 3.  $\lambda$  Him III : 40ng/ $\mu$  L, 4.  $\lambda$  Him III : 20ng/ $\mu$  L, 5. 栃木 7 号- 1, 6. 栃木 7 号- 2, 7. 栃木 7 号- 3, 8. 栃木 7 号- 4, 9. 栃木 7 号- 5, 10. ひとめぼれ, 11. 晴れすがた, 12. コシヒカリ, 13. アキニシキ, 14. 月の光, 15. あさひの夢.

泳動した各品種の DNA 量は 1  $\mu$  L.



第2図 水稻から抽出したDNAのアニーリング温度の変化による増幅の違い.  
Mは200bp DNA ladder.  
プライマーはOPB18.



第3図 水稻から抽出した鋳型DNA量によるDNA増幅の違い.  
Mは200bp DNA ladder.  
上記はプライマー名.  
各プライマー毎に、左から50, 25, 20, 10, 5ng/ $\mu$ L.

1200bp 付近に明瞭なバンドが現れ、温度が高くなるにつれ濃くなり、44.3 °C から安定した。鋳型 DNA の濃度では用いた 3 プライマーとも同様の傾向を示し 50, 25, 20, 10, 5ng /  $\mu$  L と濃度が薄くなるにつれて増幅したバンド数は増加し明瞭となった（第 3 図）。

品種識別マーカー開発のために供試した 23 プライマーの内、22 プライマーで増幅がみられ、合計 178 バンドが検出できた。これらのバンドの内、DNA 多型が認められたのは 13 プライマーで 25 バンドあった。DNA 多型が認められたランダムプライマーについては、最低 2 回 DNA 多型を再確認した。その結果、明瞭かつ再現性の高い多型を DNA マーカーとした。得られた DNA マーカーは 12 プライマーにおいて 17 種類に絞られた（第 1 表）。これらの DNA マーカーにおいて栃木 7 号の系統間で多型は見られなかった。178 マーカーで多型が見られなかったことから、ほぼ固定していると推察された。そこで、栃木 7 号に関しては系統毎ではなく、栃木 7 号として表示した。

これらの 17 種類の DNA マーカーの内、プライマー OPD2 を用いて増幅した 800bp の DNA マーカーと A09 で増幅した 1600bp の DNA マーカーで得られた多型は同じであった。プライマー A03 の 810bp で得られた多型は美山錦にのみ出るポジティブな品種特異的マーカーであった。また、OPM2 の 1000bp で得られた多型は栃木 15 号のみに DNA マーカーが現れないネガティブな特異的マーカーであった。さらに、OPB1, OPB18, OPC9, OPD2, OPD3, OPG6, OPS13 の 7 種類のランダムプライマーで増幅された 9 マーカーを用いることによって、供試した 20 品種すべてを識別することができた（第 4 図）。第 1 表に○印を付けて示したのがこれらのプライマーおよび DNA マーカーの長さである。また、7 プライマーの塩基配列を第 2 表に示した。

## 考 察

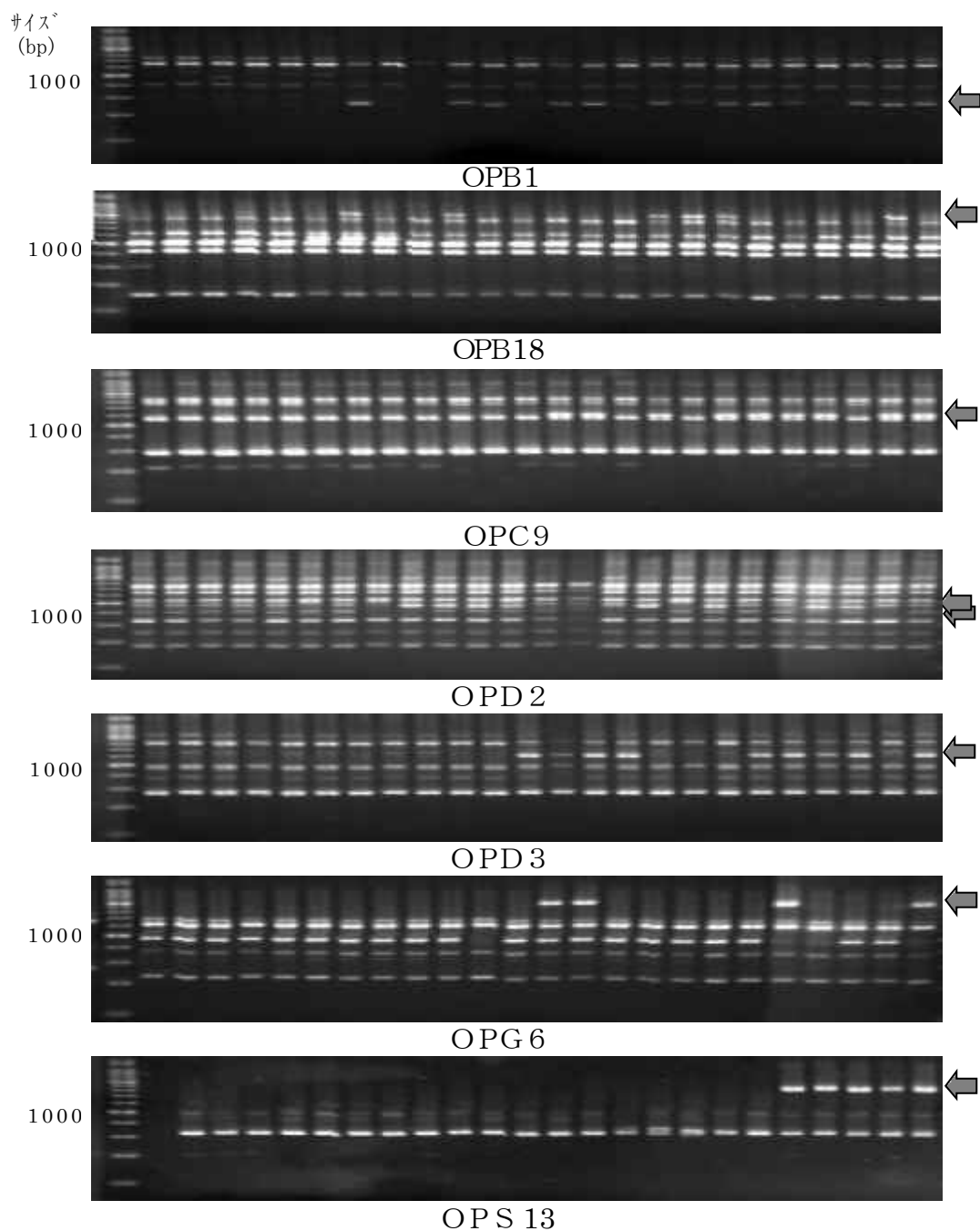
従来、アニーリングは 36 ～ 40 °C で行われている例が多いが、まず、35 °C から 46 °C までの温度で検討した。その結果、アニーリング温度は従来実施されている例より高い 44 °C が適していた。また、鋳型 DNA の濃度は薄くなるにつれてバンド数が増加し、パター

第1表 RAPD分析による水稻の品種識別.

識別セット	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
プライマー名	OPB1	OPB18		OPC9		OPD2		OPD3	OPG5		OPG6		OPG13	OPM2	OPS13	A03	A09
マーカー長(bp)	500	1100	2200	1200	430	980	800	1200	1000	800	2200	980	650	1000	1800	810	1600
栃木7号	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1
ひとめぼれ	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
晴れすがた	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
コシヒカリ	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
アキニシキ	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
月の光	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
あさひの夢	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
栃木13号	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
栃木15号	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1
キヌヒカリ	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1
ゆめひたち	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
日本晴	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
ゴロピカリ	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
朝の光	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
栃木酒14号	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1
五百万石	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1
ひとごころ	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1
美山錦	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
山田錦	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
若水	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1

DNA多型の現れたマーカーの品種毎の有無を0 (バンド無し), 1 (バンド有り)で示した.

○印は20品種の識別に必要なマーカーを示している.



第4図 供試した水稻 20 品種を識別できる7種類のランダムプライマーで検出される DNA. 図の下にランダムプライマー名を示す. 図はいずれも左のレーン 1 番目から, 1.サイズマーカー (200bp DNA ladder), 2.栃木 7 号-1, 3.栃木 7 号-2, 4.栃木 7 号-3, 5.栃木 7 号-4, 6.栃木 7 号-5, 7.ひとめぼれ, 8.晴れすがた, 9.コシヒカリ, 10.アキニシキ, 11.月の光, 12.あさひの夢, 13.栃木 13 号, 14.栃木 15 号, 15.キヌヒカリ, 16.ゆめひたち, 17.日本晴, 18.ゴロピカリ, 19.朝の光, 20.栃木酒 14 号, 21.五百万石, 22.ひとごち, 23.美山錦, 24.山田錦, 25.若水. 矢印が識別マーカー.

第 2 表 水稻品種を識別するランダムプライマーの塩基配列.

プライマー名	塩基配列 (5' → 3')
O P B 1	G T T T C G C T C C
O P B 1 8	C C A C A G C A G T
O P C 9	C T C A C C G T C C
O P D 2	G G A C C C A A C C
O P D 3	G T C G C C G T C A
O P G 6	G T G C C T A A C C
O P S 1 3	G T C G T T C C T G

ンは明瞭となった。以上の結果から、鋳型 DNA は  $5\text{ng} / \mu\text{L}$  とし、PCR 条件は熱変性を  $94^\circ\text{C}$  で 3 分後、 $94^\circ\text{C}$  で 1 分間、アニーリングを  $44^\circ\text{C}$  で 1 分間、 $72^\circ\text{C}$  を 2 分間で 1 サイクルとして 40 サイクル行い、伸長反応を  $72^\circ\text{C}$  で 2 分間行うのが最も好適な条件であると考えられた。以後、すべての PCR はこの条件で実施した。

本論文では、RAPD 分析のみを用いて栃木県水稻優良品種を識別できるマーカーの組合せを見出した。イネ品種の識別法としては、RAPD 分析の他に RFLP 分析、SSR 分析および AFLP 分析等が実施されている。将来的に採種担当者および農業協同組合関係者等の現場での利用を前提として考えた場合、操作方法の簡易性および安全性を考慮する必要がある。RFLP 分析は操作が煩雑であり、この目的にそぐわない。一方、SSR 分析や AFLP 分析は DNA マーカーの長さが短い場合が多く、電気泳動の際、アガロースゲルよりもポリアクリルアミドゲルが適している。しかし、ポリアクリルアミドゲルの材料となるアクリルアミドは毒性が強く、使用する際には熟練を要する。また、アガロースゲルを使用する場合には、アガロース濃度を高める必要がある。1.5 % 程度のアガロースゲルは作製も容易で染色する際のハンドリングも良く安全である。この濃度で検出しやすい DNA マーカーの長さは 400bp から 2400bp までである。そこで、本研究ではこれらの長さの DNA マーカーを検出するのに最も適していると考えられる RAPD 分析を採用した。

RAPD 分析を用いたイネの品種識別法は、大坪ら (1997) や小笠原・高橋 (2000) によって確立されている。しかし、栃木県育成品種については知見が無い。そこで、筆者は栃木県内で生産されている、または生産される可能性の高い品種について RAPD 分析を適用した。大坪ら (1997) は当初、10 品種を識別するために 600 プライマーを検討した。それに対し筆者はわずか 23 プライマーで 19 品種を識別できるランダムプライマーを選定できた。これは、これまでの品種識別に関する文献を参考に多型の出る可能性が高いランダムプライマーを使用したためである。今後も新しい品種が出てくる毎にこれまでの情報を有効に利用することが必要である。本論文では前述のような理由で RAPD 分析のみで識別を行った。しかし、今後はより近縁度の高い品種が多数開発される可能性が高く、

さらに効率的に多型を検出することが必要である．そのためには，RAPD 分析だけではなく，AFLP 分析，SSR 分析等も実施する必要性が考えられる．また，イネで使用している例は少ないが，イチゴ（Kunihisa ら 2003）やオオムギ（内村ら 2004）の品種識別に利用されている CAPS 分析や，品種識別を目的とはしていないがオオムギ（Fernandez ら 2002）やイチゴ（Cekic ら 2001）で用いられている Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) 分析も有効な手法と思われる．

本論文では DNA を MagExtractor -Plant Genome- DNA 抽出キットを用いて生葉身から抽出した．実際には，種子生産や米の流通関係者が識別業務を行うことが予想され，穀粒から抽出した DNA を使用することになると考えられる．吉田ら（注：平成 10 年度兵庫県成果情報）は酒米 5 品種で，RAPD 分析による品種識別法を開発した．その中で生葉，および米粒から抽出した DNA において検出された多型バンドは同一であることを確認しており，本論文で得られた品種識別法についても，穀粒から抽出した DNA を用いることは可能と考えられる．

今後、実用性を高めるには穀粒から抽出する簡便な方法が必要とされよう．一般には CTAB 法（Murray and Thompson 1980），およびその改変法や市販されている DNA 抽出キットが使用されているが，CTAB 法は操作手順が多く時間がかかる．また，DNA 抽出キットは高額である．生葉身については非常に簡便な DNA 抽出法（池田ら 2000）が確立されている．本研究で確立した品種識別法を現場に適用するまでにはさらに簡易で安価な穀粒からの DNA 抽出方法を確立する必要があると考えられた．染色についても，エチジウムブロマイドよりも安全性の高い蛍光色素が市販されていることから，それらの利用についても組み合わせて検討していく必要があると考えられた．

## まとめ

栃木県産米の品質向上および原種，および原々種の混種防止を目的として，栃木県奨励品種を中心に，品種登録申請中の栃木 7 号，および栃木酒 14 号（酒造好適米）等，合計 20



品種についての RAPD 分析による品種識別技術を確立した。PCR 条件は、鋳型 DNA を  $5\text{ng}/\mu\text{L}$  とし、熱変性を  $94^{\circ}\text{C}$  で 3 分後、 $94^{\circ}\text{C}$  で 1 分間、アニーリングを  $44^{\circ}\text{C}$  で 1 分間、 $72^{\circ}\text{C}$  を 2 分間で 1 サイクルとして 40 サイクル行い、伸長反応を  $72^{\circ}\text{C}$  で 2 分間行うのが最も好適な条件であった。これらの品種識別は 7 種類のランダムプライマーを用いて DNA を増幅した後、1.5 %アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド溶液で染色後に現れた 9 種類の DNA マーカーの多型を比較することで可能であった。

栃木 7 号の系統間に多型は検出されなかった。

### 第3章 RAPD分析による栃木県を中心とした関東周辺地域のムギ類優良品種識別

栃木県のムギ類生産は水田農業経営確立対策の推進等により 2000 年産から増加しており、2003 年産の作付面積は作付けの無い裸ムギを除いた 3 麦計で 15800ha、収穫量は 62000t であり、ムギ類は本県農業の重要な土地利用型作物となっている。しかし、2000 年から進められてきた民間流通の影響から、産地間の品質評価に格差が広がっている。また、全国的な生産増加の反面、品種や品質は必ずしも実需者側からの要望に応えられていないことから、その解消が大きな課題となっており、栃木県では需要動向に応じた作付誘導、品質向上対策および優良品種の導入を図っている。コムギでは実需者から品質面で評価の低かったバンドウワセを廃止し、やや低アミロースであるイワイノダイチを 2000 年に、醤油醸造用のタマイズミを 2002 年に奨励品種として採用した。さらに、地産地消の推進の影響を受け、製パン用のニシノカオリの導入を検討中である。六条オオムギでは 1995 年にシュンライを奨励品種に採用し、2005 年産からシュンライより加工適性の優れる東山皮 101 号を、醸造用二条オオムギについては 2000 年にスカイゴールデンを奨励品種に採用し、さらに醸造適性の高い関東二条 35 号を検討中である。

このような品種のめまぐるしい変化の状況は、水稻と同様に原々種や原種生産において作業の煩雑さの増加をともない混種および取り違えの危険性を高めており、ムギ類でも簡便で正確な品種識別技術に対する要望は高まっている。

そこで本章では、DNA マーカーの中で最も検出操作が簡便な RAPD 分析を用い、栃木県の奨励品種を中心として関東周辺地域の奨励品種並びに栃木県農業試験場で有望視している系統を識別できる RAPD マーカーの組み合わせを明らかにしようとした。

#### 1. コムギの優良品種識別

栃木県のコムギ生産は、1997 年には作付面積が 2130ha、収穫量が 8690t であったが、2003 年には作付面積が 2540ha、収穫量が 9860t に増加した。このように、減少傾向で

あったコムギの生産は、順調に生産振興が図られてきた。しかし、2000 年から進められてきた民間流通の影響から、産地間の品質評価に格差が広がっている。また、従来は、オーストラリア産スタンダードホワイト（ASW）に近い製麺適性を持つ品種を中心に選定してきたが、麺の食感の優れる低アミロース品種や、硬質である醤油醸造用および製パン用コムギ品種が採用されてきている。このような用途の多様化に合わせた品種の採用は加工適性が大きく異なり、生産や流通過程での取り違えもいままで以上に大きな問題となる。これらの情勢から今後、コムギ品種の簡便で正確な品種識別技術に対する要望は高まってくると考えられる。

しかし、国内コムギ品種の DNA マーカーを利用した品種識別については、内村ら（注：平成 12 年度福岡県農業総合試験場成果情報）が福岡県内の主要 4 品種について RAPD 分析で実施しているのみである。

そこで本節では、DNA マーカーの中で最も検出操作が簡便な RAPD 分析を用い、栃木県のコムギ奨励品種を中心とし、関東周辺地域の奨励品種を識別できる RAPD マーカーの組合せを明らかにしようとした。さらに、古い品種である小麦農林 61 号の変異についても検討した。

## 材料と方法

### (1) 供試品種

供試品種は、関東主要各都県の奨励品種である小麦農林 61 号（茨城県産，群馬県産，埼玉県産，千葉県産，東京都産，静岡県産，栃木県産および福岡県産），イワイノダイチ，タマイズミ，春のかがやき，きぬの波，つるぴかり，ダブル 8 号，シラネコムギ，あやひかり，小麦農林 26 号，キヌヒメ，ユメセイキ，フウセツ，しゅんよう，ユメアサヒ，バンドウワセ，および栃木県農業試験場で製パン用として有望視しているニシノカオリの合計 17 品種である。各都県産原々種または原種を供試した。各品種の交配組合せおよび育成地を第 3 表に示した（農業技術協会 2003）。

第3表 コムギ供試品種の交配組合せ及び育成地

品種名	交配組合せ	育成地
小麦農林61号	福岡小麦18号/新中長	佐賀県農業試験場
イワイノダイチ	秋9/西海68号(きぬいろは)	九州農業試験場
タマイズミ	関係w364/関係w361	農業技術研究所 穀作物研究所
春のかきやき	西海68号(きぬいろは)/関東100号(バンドウセ)	群馬県農業技術センター
きぬの波	関東107号/関東100号(バンドウセ)	群馬県農業試験場
つるひかり	関東100号(バンドウセ)/関東107号	群馬県農業総合試験場
ダブル8号	シラネコムギ/ハルカリ//シラネコムギ	群馬県農業技術センター
シラネコムギ	北陸49号/東海80号	長野県農事試験場
あやひかり	関東107号/西海68号(きぬいろは)	農業研究センター
小麦農林26号	新中長/埼玉小麦29号	奈良県農業試験場
キヌヒメ	関東95号/東山18号//ニシカゼコムギ	長野県農事試験場
ユメセイキ	関東107号/東山24号	長野県農事試験場
フウセツ	東山23号/東山22号	長野県農事試験場
しゅんよう	東北148号/東山10号	長野県農事試験場
ユメアサヒ	西海79号/KS831957	長野県農事試験場
バンドウワセ	関東66号/ヒヨクコムギ	農業研究センター
ニシノカオリ	北見春42号/西海157号(アブクマワセ)	九州農業試験場

交配組合せの( )内は後に付された品種名。

小麦農林 61 号は 1945 年に佐賀県農業試験場において育成された古い品種であるが、育成した佐賀県では 1995 年に奨励品種から廃止した。よって、原種の提供を受けられないことから、現在も奨励品種として採用している県は独自に原々種、原種を長期間に渡り維持している。そのため、採種条件の違いにより変異が生じていると考えられることから、現在も奨励品種として採用しており、佐賀県が奨励品種から廃止した時に原々種の譲渡を受け最も近い福岡県を始め、関東地域の採用県から種子を収集し供試した。

## **(2) DNA の抽出**

ポットに栽培したムギの第 3 ～ 4 葉の生葉身 0.1g から、水稻と同様に MagExtractor -Plant Genome- DNA 抽出キット（東洋紡績株式会社）、および同社製自動核酸抽出装置（MFX - 2000）を用いて抽出を行った。

## **(3) RAPD 分析による品種識別**

抽出した DNA は、1 / 10TE バッファーを用いて、10ng /  $\mu$  L に調製し、鋳型 DNA 量として 1  $\mu$  L 使用した。PCR 反応液はランダムプライマー 7.8  $\mu$  M を 0.8  $\mu$  L、dNTP 混合液 2.5 mM（タカラバイオ社）を 1  $\mu$  L、反応バッファー（タカラバイオ社）を 1.25  $\mu$  L および rTaq（タカラバイオ社）0.5unit に滅菌蒸留水を加え 12  $\mu$  L とした。PCR 増幅は、サーマルサイクラー DNA Engine Tetrad PTC - 225（MJ Japan 社）を用い、熱変性を 95  $^{\circ}$ C で 3 分後、95  $^{\circ}$ C で 1 分間、アニーリングを 44  $^{\circ}$ C で 1 分間、72  $^{\circ}$ C で 2 分間を 1 サイクルとして 40 サイクル行い、伸長反応を 72  $^{\circ}$ C で 2 分間行った。増幅した DNA は 1.5 % アガロースゲルを用い 100 V の電圧で約 90 分間の電気泳動を行った。電気泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイド溶液で 30 分間染色後、デンストグラフ AE - 6920 - FX（アトー社）を用い PCR 増幅産物を確認し、バンドの有無による DNA 多型を検出して品種識別を行った。

品種識別のためのプライマーは、大坪ら（1997）、吉橋ら（1999）、森ら（2001）、Kuczynska ら（2001）および内村ら（2004a）等を参考に、水稻、オオムギで多型を示すと報告されている 28 プライマーを選定した。そのうち、24 プライマーは 10 量体（オ

ペロン社), 4 プライマーは 12 量体 (日本ジーン社) である.

## 結 果

供試した 28 プライマーの内, OPB2 および OPD10 の 2 プライマーで増幅が見られなかった. 残り 26 プライマーの中で増幅の劣るバンドも含め, 合計 207 バンドが検出できた. これらのバンドの内, 再現性があったのは 153 バンドであった. 品種間の DNA 多型が認められたのは 14 プライマーで 37 バンドであった. DNA 多型が認められたランダムプライマーについては, 再現性の確認のため, 最低 2 回 DNA 多型を確認した. その結果, 明瞭かつ再現性の高い多型を DNA マーカーとした. 得られた DNA マーカーは 14 プライマーにおいて 23 種類に絞られた (第 4 表). これらの DNA マーカーの内, プライマー OPG6 を用いて増幅した 1500bp の DNA マーカーは小麦農林 61 号のみにバンドが出るポジティブな品種特異的マーカーであった. また, ネガティブな DNA マーカーでは A08 の 300bp がしゅんように, A09 の 1400bp がユメセイキのみに特異的に現れなかった.

さらに, OPA11, OPD18, OPG16, A01, A09 の 5 種類のランダムプライマーで増幅された 6 マーカーを用いることによって, 供試した 17 品種すべてを識別することができた (第 5 図). 第 4 表に○印を付けて示したのがこれらのプライマーおよび DNA マーカーの長さである. これらの識別マーカーについては, 同一品種の異なる植物体から DNA を抽出し, 同一条件で RAPD 分析を行い再現性について確認を行った. また, 5 プライマーの塩基配列を第 5 表に示した.

小麦農林 61 号については, 県の系統間で 2 種類の DNA マーカーにより多型が認められた (第 6 図). これらのマーカーについては, 第 4 表に△印を付けて示した.

## 考 察

今回, 筆者は開発にコストがかからず, また将来的に採種担当者および農業協同組合関係者等現場で識別できる方法を前提として RAPD 分析を選択した. これら現場で分析さ

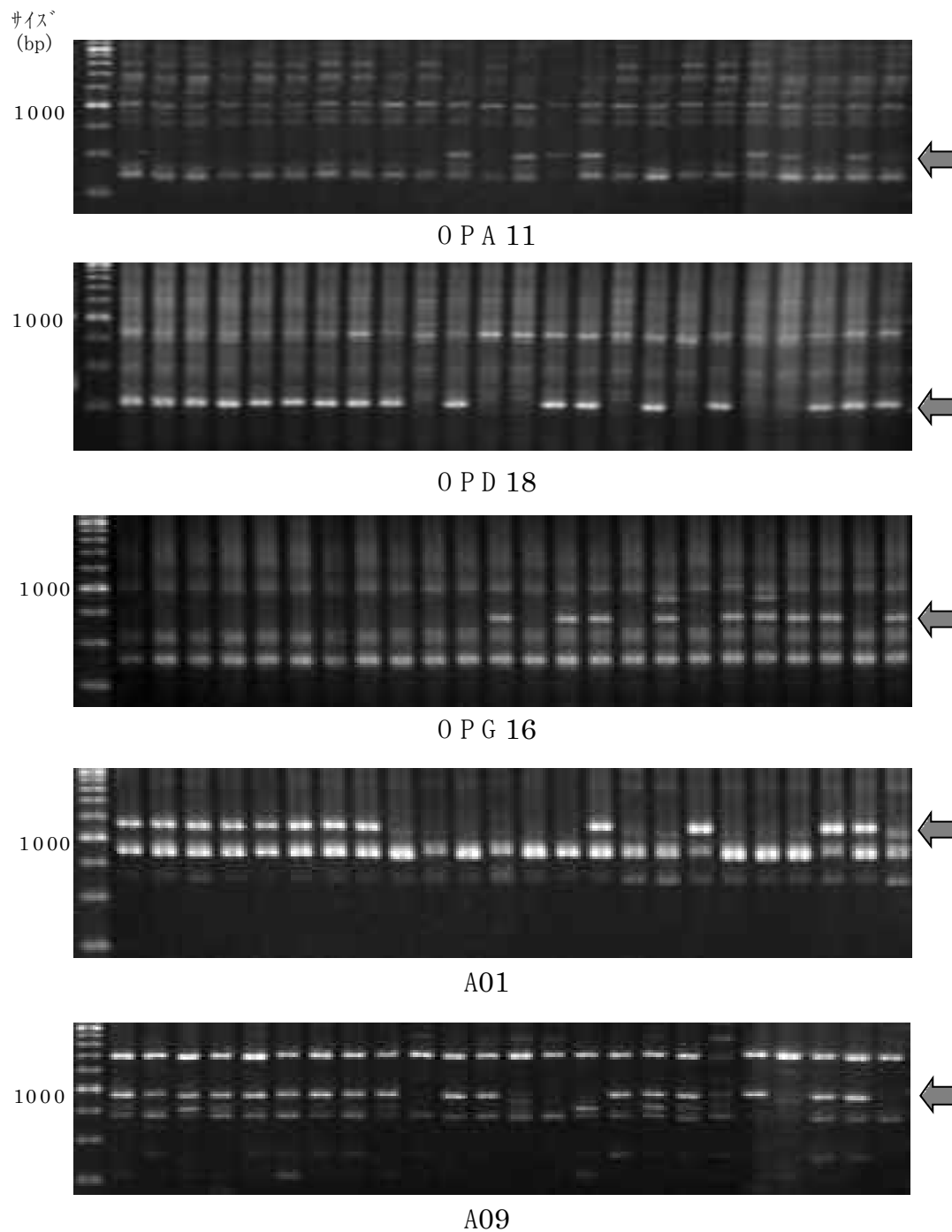
第4表 RAPD分析によるコムギの品種識別.

プライマー名 マーカ長(bp)	OPA11		OPB1		OPB18 OPC4		OPD2		OPD18	OPG6	OPG13	OPG16		OPS13	OPT16		A01	A08			A09			
	1600	600	1250	480	1200	2200	750	1200	420	1500	1000	900	700	750	1050	1000	1100	1400	500	300	1400	980	630	
識別セット	○		△						○				○				○				○		○	△
小麦農林61号 (福岡県)	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
小麦農林61号 (茨城県)	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
小麦農林61号 (群馬県)	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
小麦農林61号 (埼玉県)	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
小麦農林61号 (千葉県)	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
小麦農林61号 (東京都)	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
小麦農林61号 (静岡県)	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
小麦農林61号 (栃木県)	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
イワイノダイチ	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
タマイズミ	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
春のかがやき	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
きぬの波	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
つるぴかり	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
ダブル8号	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
シラネコムギ	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
あやひかり	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
農林26号	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0
キヌヒメ	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0
ユメセイキ	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
フウセツ	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0
しゅんよう	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
ユメアサヒ	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
バンドウワセ	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0
ニシノカオリ	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0

DNA多型の現れたマーカの品種毎の有無を0 (バンド無し), 1 (バンド有り)で示した.

○印は17品種の識別に必要なマーカを示している.

△印は農林61号に多型バンドが出ているマーカを示している.



第 5 図 供試したコムギ17品種を識別できる 6 種類のランダムプライマーで検出されるDNA.

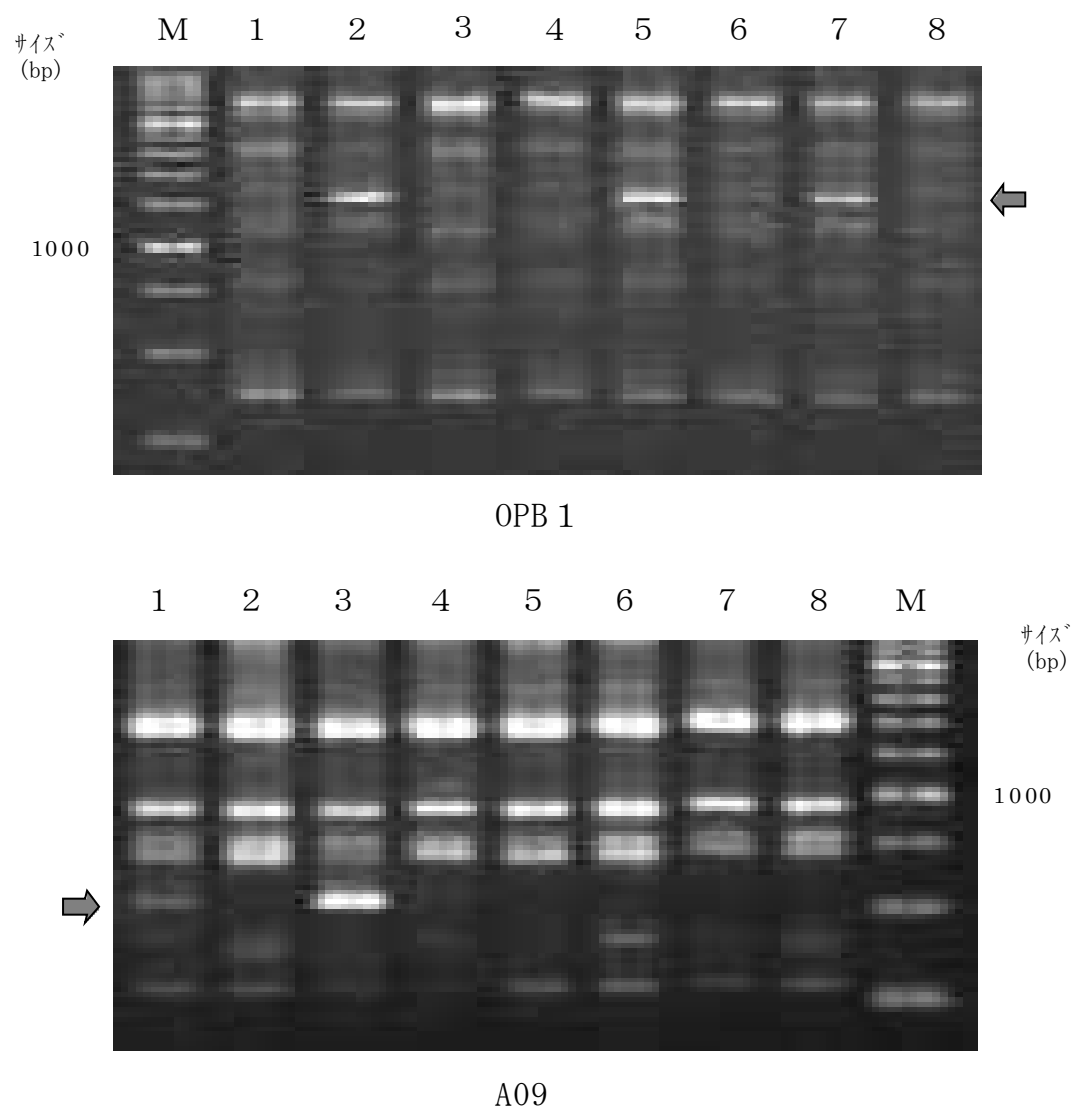
図の下にランダムプライマー名を示す. 図はいずれも左のレーン1番目から, 1. サイズマーカー (200bp DNA ladder) , 2. 小麦農林61号(福岡県), 3. 同(茨城県), 4. 同(群馬県), 5. 同(埼玉県), 6. 同(千葉県), 7. 同(東京都), 8. 同(静岡県), 9. 同(栃木県), 10. イワイノダイチ, 11. タマイズミ, 12. 春のかがやき, 13. きぬの波, 14. つるぴかり, 15. ダブル8号, 16. シラネコムギ, 17. あやひかり, 18. 小麦農林26号, 19. キヌヒメ, 20. ユメセイキ, 21. フウセツ, 22. しゅんよう, 23. ユメアサヒ, 24. バンドウワセ, 25. ニシノカオリ.

矢印が識別マーカー.



第5表 コムギ品種識別のためのランダムプライマーの塩基配列.

プライマー名	塩基配列 (5' →3')
OPA11	CAATCGCCGT
OPD18	GAGAGCCAAC
OPG16	AGCGTCCTCC
A01	TGCACTACAACA
A09	CCGCAGTTAGAT



第6図 農林61号に見られた多型.

図の下にランダムプライマー名を示す.

M. サイズマーカー (200bp DNA ladder) , 1. 福岡県産, 2. 茨城県産, 3. 群馬県産, 4. 埼玉県産, 5. 千葉県産, 6. 東京都産, 7. 静岡県産, 8. 栃木県産.

矢印が多型.

れる場面は、圃場で異株が現れた場合の確認や生産物を出荷する時に限られ、季節的な分析に限られる。また、従事者は数年おきに異動があり煩雑また危険を伴う操作に習熟するのは困難な場合が多い。つまり、操作が簡易で安全かつ低コストである方法を前提とした。前章で述べたように、CAPS 分析は手順が煩雑になるとともに時間およびコストが増加する。SSR 分析は電気泳動の際、アガロースゲルよりもポリアクリルアミドゲルが適しているが、アクリルアミドは神経毒が強く危険を伴い、使用する際には熟練を要する。アガロースゲルを使用する場合には、アガロース濃度を高くする必要がある電子レンジを用いて作製する時は濃度を高くすると突沸し易く作成が難しい。1.5 %程度のアガロースゲルが作製も容易で染色する際の操作性も良く安全である。以上のことから RAPD 分析を採用した。

大坪ら（1997）はイネの品種識別マーカーを開発する際、当初、10 品種を識別するために 600 プライマーを検討した。筆者はこれまでの品種識別に関する文献を参考に多型の出る可能性が高いランダムプライマーを使用した。その結果、28 プライマーでコムギ 17 品種を識別できるランダムプライマーセットを選定できた。さらに、小麦農林 61 号は県間で多型が見られた。これは、供試した各県の実地種や原種の維持は長期間に渡り各県独自に行われており、異なる地域と方法で選抜・淘汰されてきたためと考えられる。

今後出てくる新しい品種についても、いままでの情報を有効に利用することが必要と思われる。また、前章でイネの品種識別マーカーを開発する時に多型の現れた 12 種類の内、7 種類がコムギでも使用できたことはイネとコムギの場合、共通のランダムプライマーが使用できる可能性を示唆していると思われた。

本論文では再現性が高く、かつ、明瞭なバンドを DNA マーカーとして選抜した。しかし、一般的に RAPD 分析は他の DNA マーカーに比較して再現性が低いと言われている。水稻では大坪ら（2002）や小笠原ら（2000）が、STS 化することにより視認性を高め、さらに、マルチプレックス化することによって操作回数を減らし簡便化することにより、実用化を図っている。また、イチゴにおいても田崎ら（2004）が STS 化し、国内主要品

種を含む 16 品種の中で栃木県育成のとちおとめおよびとちひめを識別できるプライマーを開発し、今後マルチプレックス化を行う予定であると述べている。コムギにおいても、同様にこれらの手法を用いて、実用化を図る必要がある。

また、DNA マーカーを研究者以外が使用する場合に残された課題がある。今回の実験では DNA 抽出は、生葉身から市販の DNA 抽出キットを用いて行った。実際には、種子生産やムギ類の流通関係者がこの識別業務を行うことが予想され、より簡便で安価な方法で DNA を抽出する必要がある。イネの葉からの抽出では超簡単 DNA 抽出法（池田ら 2000）が開発されている。バレイショでも葉から簡易に DNA を抽出する方法が開発されている（森ら 2003）。現場で適用するには葉と同様に穀粒から簡易で安価な DNA 抽出方法を開発する必要があると考えられた。染色についても、より安全性の高い蛍光色素の利用について検討していく必要があると考えられた。

## 2. オオムギの優良品種識別

栃木県におけるオオムギの生産は、六条オオムギでは 1995 年には作付面積がわずか 61ha、収穫量が 261t であったが、2003 年には作付面積が 2370ha、収穫量が 10100t まで増加した。二条オオムギは主にビール醸造用であり、1999 年に作付面積が 9320ha、収穫量が 33400t まで落ち込んだが、2003 年には 10900ha、42000t まで回復した。このように、減少傾向であったオオムギの生産は、コムギと同様に、順調に生産振興が図られているように見える。しかし、2000 年から進められてきた民間流通の影響から、産地間の品質評価に格差が広がっている。また、全国的な生産増加の反面、品種や品質は必ずしも実需者側からの要望に応えられていない。

そのため、オオムギ品種の簡便で正確な品種識別技術に対する要望は高いが、国内オオムギ品種の DNA マーカーを利用した品種識別については、Turuspekov ら（2001）が主要精麦用オオムギを SSR 分析で、内村ら（2004a）が二条オオムギで CAPS 分析を行っているに過ぎない。

以上の事から、本節ではコムギと同様に DNA マーカーの中でも開発が低コストで済み、また、最も検出操作が簡便である RAPD 分析を用い、栃木県の奨励品種を中心として関東周辺地域の奨励品種を識別できる RAPD マーカーの組合せを明らかにしようとした。

## 材料と方法

### (1) 供試品種

供試品種は二条オオムギのミカモゴールドン、スカイゴールドン、あまぎ二条、なす二条、みょうぎ二条、タカホゴールドン、きぬか二条、はるな二条、および栃木県農業試験場で有望視している関東二条 35 号、六条オオムギのシュンライ、東山皮 101 号、ミノリムギ、カシマムギ、マサカドムギ、さやかぜ、すずかぜ、ファイバースノウ、セツゲンモチ、および参考として埼玉県で奨励品種に採用している裸ムギのイチバンボシの合計 19 品種である。各都県産原々種または原種を供試した。各品種の交配組合せおよび育成地を第 6 表に示した（農業技術協会 2003）。

関東二条 35 号は雑種第 13 代であり、品種に向けて検討しているものの DNA マーカー開発のために供試できる程度まで固定が完全であるか検討していないことから、系統育種法で維持してきた雑種第 11 世代での 1 個体由来の 5 系統を供試した。

### (2) DNA の抽出

コムギと同じ方法で抽出を行った。

### (3) RAPD 分析による品種識別

抽出した DNA は、1 / 10TE バッファーを用いて 5ng /  $\mu$  L に調製し、鋳型 DNA 量として 1  $\mu$  L 使用した。プライマー、PCR 反応液、PCR 増幅、電気泳動、およびアガロースゲルの染色はコムギと同じ方法を用いた。染色後、デンストグラフ AE - 6920 - FX（アトー社）を用い PCR 増幅産物を確認し、バンドの有無による DNA 多型を検出して品種識別を行った。

第6表 供試品種の交配組合せ及び育成地

麦種	品種名	交配組合せ	育成地
二条 オオムギ	関東二条35号	大系R4224/関東二条29号	栃木県農業試験場栃木分場
	ミカモゴールドン	南系B4718/新田二条1号(はるな二条)	栃木県農業試験場栃木分場
	スカイゴールドン	関東二条25号/栃系216	栃木県農業試験場栃木分場
	あまぎ二条	ふじ二条/成城17号	キリンビール(株)
	なす二条	成系5/5-3//成系5	キリンビール(株)
	みょうぎ二条	栃系144(ミトゴールドン)/やす系50(さつきばれ)	サッポロビール(株)
	タカホゴールドン	大系R2068/栃系144(ミトゴールドン)	栃木県農業試験場栃木分場
	きぬか二条	83SBC27/吉系8(ミノゴールド)	キリンビール(株)
	はるな二条	G65/K-3//さつき二条	サッポロビール(株)
六条 オオムギ	シュンライ	ミノリムギ/東山皮68号	長野県農事試験場
	東山皮101号	東山皮73号/東山皮86号	長野県農事試験場
	ミノリムギ	東山皮1号/コウゲンムギ	長野県農事試験場
	カシマムギ	北関東皮3号/ムサシノムギ	農事試験場
	マサカドムギ	Ea52/関東皮53号	農業研究センター
	さやかぜ	関東皮70号/関東皮68号(すずかぜ)	農業技術研究機構作物研究所
	すずかぜ	鴻系RB3017-5/関係b316	農業研究センター
	ファイバースノウ	東山皮85号/東山皮86号	長野県農事試験場
裸ムギ	セツゲンモチ	弥富モチ/東山皮83号//東山皮82号	長野県農事試験場
	イチバンボシ	四国裸58号/四R系697	四国農業試験場

交配組合せの( )内は後に付された品種名。

## 結 果

供試した 28 プライマーの内、コムギと同じ 2 プライマーで増幅が見られなかった。残り 26 プライマーの中で増幅の劣るものも含め、合計 246 バンドが検出できた。これらのバンドの内、再現性があったのは 156 バンドであった。品種間の DNA 多型が認められたのは 16 プライマーで 64 バンドであった。DNA 多型が認められたランダムプライマーについては、最低 2 回 DNA 多型を確認した。その結果、明瞭かつ再現性の高い多型を DNA マーカーとした。得られた DNA マーカーは 16 プライマーにおいて 33 種類に絞られた(第 7 表)。関東二条 35 号の供試した系統間で多型は認められなかった。雑種第 13 世代であるが、156 バンドで多型が見られなかったことから、今回の結果からでは、関東二条 35 号はほぼ固定していると推察された。以下、関東二条 35 号については 1 品種として記述する。これらの DNA マーカーの内、OPD2 を用いて増幅した 2100bp で得られた DNA マーカーは関東二条 35 号にのみ、A08 の 1000bp はイチバンボシのみにバンドが現れるポジティブマーカーであった。ネガティブな DNA マーカーでは、OPG5 の 350bp がシェンライにのみ、OPG6 の 1500bp があまぎ二条にのみ現れなかった。OPB1 の 1900bp, および OPG16 の 850bp で得られた DNA マーカーは二条オオムギ品種にのみバンドが現れた。逆に OPG16 の 750bp は二条オオムギ以外にバンドが現れる DNA マーカーであった。A01 の 1200bp および 1050bp で得られた多型は二条オオムギのスカイゴールデンのみと二条オオムギ以外の品種にバンドが現れた。

さらに、OPA11, OPD12, OPM2, OPT16, A01, A08 の 6 種類のランダムプライマーで増幅された 9 マーカーを用いることによって、供試した 19 品種すべてを識別することができた(第 7 図)。第 7 表に○印を付けて示したのがこれらのプライマーおよび DNA マーカーの長さである。これらの識別マーカーについては、コムギと同様の方法で再現性について確認した。また、6 プライマーの塩基配列を第 8 表に示した。

## 考 察

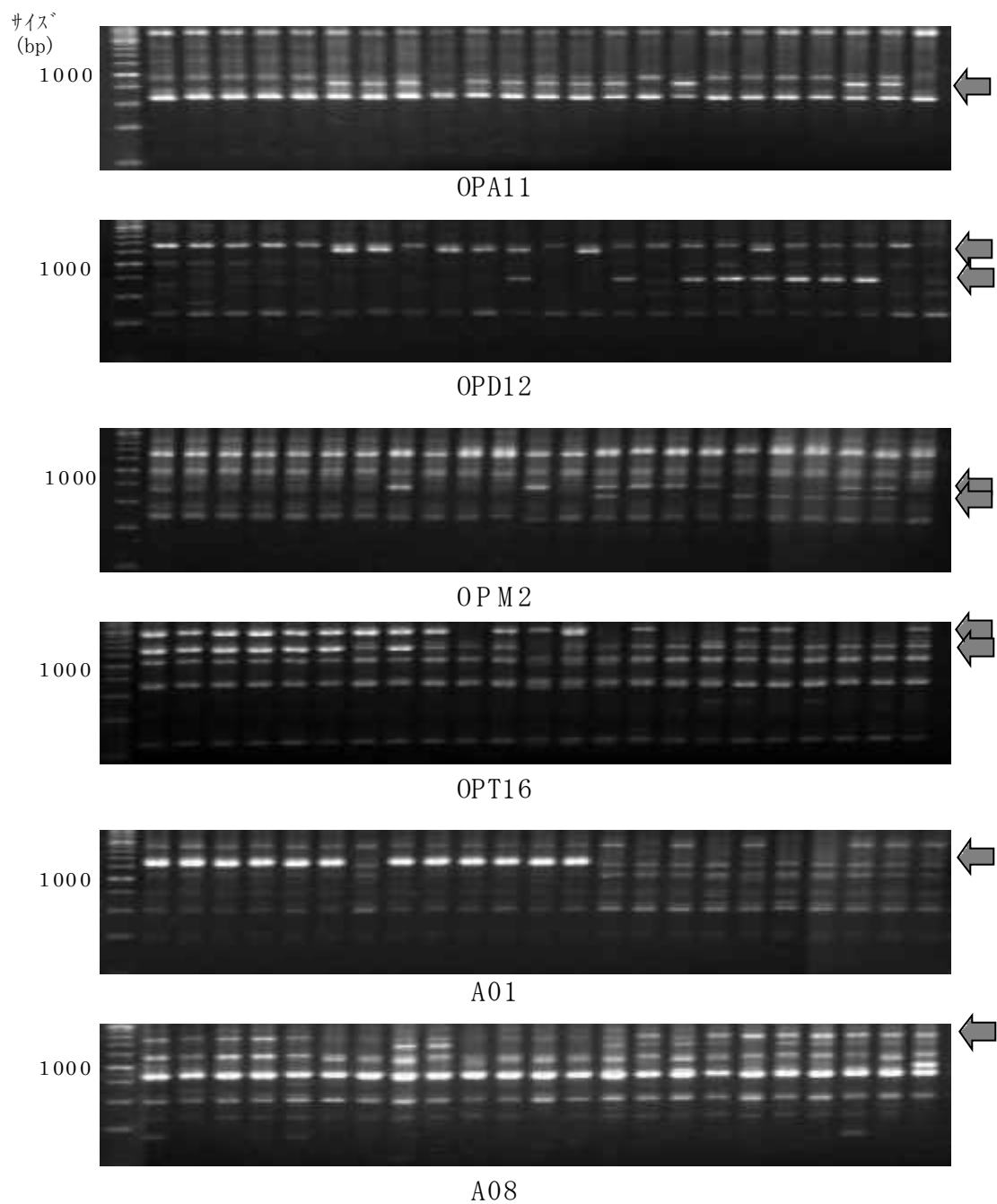
第7表 RAPD分析によるオオムギの品種識別.

プライマー名	OPA11	OPB1	OPC4	OPD2			OPD5			OPD12		OPD18		OPG5				OPG6				OPG13		OPG16		OPM2		OPT8	OPT16		A01			A08				
マーカー長(bp)	800	1900	1000	2100	900	580	980	350	1250	800	930	350	1500	950	550	450	1200	1100	850	750	780	680	1200	1900	1300	1300	1200	1050	1600	1300	1100	1050	1000					
識別セット	○			○ ○										○ ○										○ ○		○ ○		○		○								
関東二条35号	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0					
ミカモゴールドン	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0					
スカイゴールドン	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0					
あまぎ二条	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0					
なす二条	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0					
みょうぎ二条	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0					
タカホゴールドン	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0				
きぬか二条	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0				
はるな二条	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0				
シュンライ	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0					
東山皮101号	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0				
ミノリムギ	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0					
カシマムギ	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0				
マサカドムギ	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0				
さやかぜ	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0				
すずかぜ	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0				
ファイバースノウ	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0				
セツゲンモチ	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0					
イチバンボシ	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1				

DNA多型の現れたマーカーの品種毎の有無を0 (バンド無し), 1 (バンド有り) で示した.

○印は19品種の識別に必要なマーカーを示している.





第7図 供試したオオムギ 19 品種を識別できる6種類のランダムプライマーで検出される DNA. 図の下にランダムプライマー名を示す. 図はいずれも左のレーン 1 番目から, 1.サイズマーカー (200bp DNA ladder) , 2.関東二条 35 号-1, 3.関東二条 35 号-2, 4.関東二条 35 号-3, 5.関東二条 35 号-4, 6.関東二条 35 号-5, 7.ミカモゴールドン, 8.スカイゴールドン, 9.あまぎ二条, 10.なす二条, 11.みょうぎ二条, 12.タカホゴールドン, 13.きぬか二条, 14.はるな二条, 15.シュンライ, 16.東山皮 101 号, 17.ミノリムギ, 18.カシマムギ, 19.マサカドムギ, 20.さやかぜ, 21.すずかぜ, 22.ファイバースノウ, 23.セツゲンモチ, 24.イチバンボシ. 矢印が識別マーカー.

第8表 オオムギ品種識別のためのランダムプライマーの塩基配列

プライマー名	塩基配列(5'→3')
OPA11	CAATCGCCGT
OPD12	CACCGTATCC
OPM2	ACAACGCCTC
OPT16	GGTGAACGCT
A01	TGCACTACAACA
A08	GCCCCGTTAGCA

コムギと同様の理由から，RAPD 分析のみを用いてオオムギ品種を識別できるマーカーを開発した．

先に述べたように，大坪ら（1997）はイネの品種識別マーカーを開発する際，当初，10 品種を識別するために 600 プライマーを検討した．筆者はこれまでの品種識別に関する文献を参考に多型の出る可能性が高いランダムプライマーを使用した．その結果，28 プライマーでオオムギ 19 品種を識別できるランダムプライマーセットを選定できた．また，二条オオムギの関東二条 35 号は，雑種第 13 代であるが系統間で多型はみられなかった．これは既に固定がなされており，かつ雑種第 11 代では，1 個体から採種したことによると考えられる．現在，品種の世代交代の期間が短縮してきており，固定が不完全なまま品種になっている例が見受けられる．こうした材料では，栽培環境が大きく変わることによって形質に分離がみられる場合がある．また，前年の気象条件によって不稔が多く周辺の異品種との自然交雑により混種となる（注：福岡県平成 9 年度秋冬作および平成 10 年度早期水稻試験成績概要書）場合もある．これらの種子を配布された原々種や原種担当者の心労は計りきれない．今後，固定度調査の中に今回のような DNA マーカーによるチェック体制を導入することも有効と考えられる．今後出てくる新しい品種についても，いままでの情報を有効に利用することが必要と思われる．

本論文の成果を実用化するには，コムギと同様に，簡易な DNA の抽出法を開発するとともに，プライマーを STS 化することにより視認性を高め，さらに，マルチプレックス化することによって操作回数を減らし簡便化する必要がある．また，さらに効率的に多型を検出するため，RAPD 分析だけではなく，AFLP 分析，SSR 分析等も実施する必要性が考えられる．

### 3. コムギ優良品種のクラスター分析による分類

近年の育成品種は加工適性の向上を最も重要な育種目標としていることから交配母本の系譜が似通ってきており，近縁度の高まっていることが懸念される．内村ら（2004b）

は、育種計画策定のために、地域に普及している品種間、交配親となる品種間の遺伝的背景を把握しておくことは地域戦略として安定多収を維持するために重要な情報となるとしている。また、新品種育成のための交配親では、育種目標となる有用遺伝子の由来を知ることが手掛かりとなり、効率的にそれらに関する遺伝子の集積を行い、新品種育成を図る情報となると述べている。そこで、その第 1 段階として、品種間の遺伝的関係を調査するため、DNA 多型データによるユークリッド距離を用いたクラスター分析を試みた。

## 材料と方法

### (1) 供試品種

供試品種は前節のコムギの優良品種識別で供試した、小麦農林 61 号，イワイノダイチ，タマイズミ，春のかがやき，きぬの波，つるぴかり，ダブル 8 号，シラネコムギ，あやひかり，小麦農林 26 号，キヌヒメ，ユメセイキ，フウセツ，しゅんよう，ユメアサヒ，バンドウワセ，およびニシノカオリの合計 17 品種である。交配の両親名，育成地などは第 3 表に示した。

### (2) クラスター分析

全品種について DNA 多型のデータ（第 4 表）を用いてクラスター分析を行い、品種間の距離をデンドログラムにより視覚化した。RAPD マーカーにより検出した DNA 多型のデータは、PCR 増幅産物が現れた場合を‘1’，無い場合を‘0’とした。数値化した DNA 多型の全データを，そのまま青木によるプログラム（注：<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/Mokuji/index2.html>）に入力し，正規化せずユークリッド距離を求め，群平均法（UPGMA）によるクラスター分析（奥野ら 1971，1976）を行った。

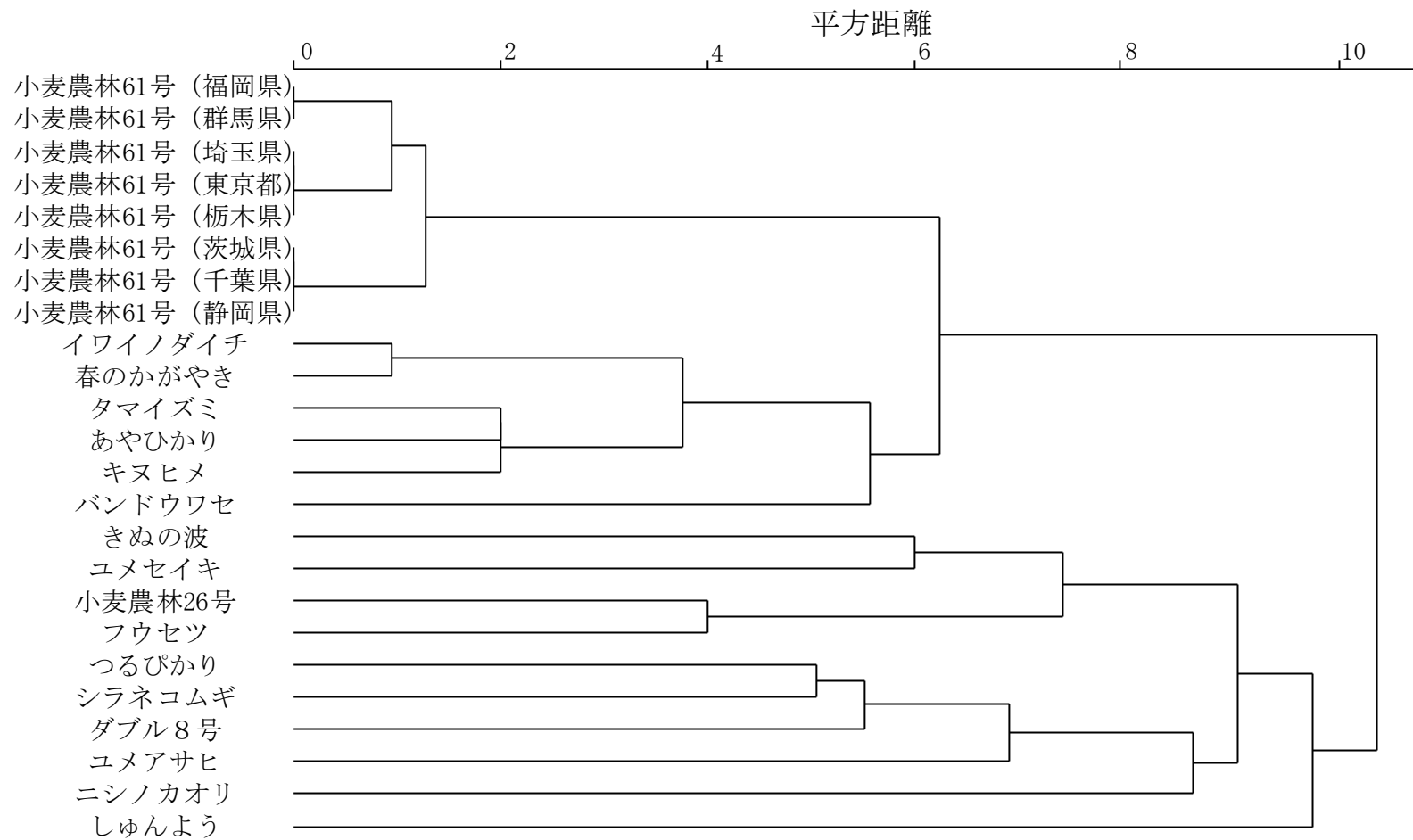
## 結 果

23 種類のマーカー（第 4 表）より計算したコムギのクラスター分析の結果として得ら

れたデンドログラムを第 8 図に示した．その結果，大きく 2 つのクラスターに分類された．小麦農林 61 号を含むクラスター (A) とそれ以外のクラスター (B) である．農業研究センターおよびその後独立法人化した農業技術研究機構作物研究所は同一場所で継続的に育種を実施していることから，同一育成地とした．この機関で育成された品種は，硬質粒で醤油醸造用のタマイズミも含めて A クラスターに分類された．九州農業試験場，長野県農事試験場および群馬県農業試験場育成の品種は一方のクラスターに偏らなかった．しかし，A クラスターに含まれる品種の祖先系統には西海 168 号，ニシカゼコムギ，およびヒヨクコムギの九州農業試験場育成品種が多く使われている傾向があった．B クラスターは大きく 3 つに分類された．低アミロース品種であるイワイノダイチ，春のかがやき，あやひかり，きぬの波，ユメセイキ，およびつるぴかりは 1 つのクラスターに含まれなかったが，硬質粒品種のダブル 8 号，ユメアサヒ，およびニシノカオリは 1 か所に集中した．B クラスターの中で最も遠い位置にあるしゅんようは東北農業試験場の系統が母本として使用されていた．小麦農林 61 号は県間の多型バンドが 2 種類あり，3 つのクラスターに分類された．福岡県と群馬県，埼玉県と東京都および栃木県，茨城県と千葉県および静岡県である．茨城県を含むグループが最も離れて位置していた (第 8 図)．

## 考 察

本論文では RAPD 分析のみで識別を行った．しかし，近縁度が高まってくると品種識別は困難になってくる可能性が高まる．そこで，現在採用されている品種の遺伝的關係を確認するため，クラスター分析を行った．コムギでは硬質粒品種は醸造用のタマイズミを除き平方距離はやや大きいながらも 1 か所に集中し，また，作物研究所育成品種が平方距離 6 を基準とすると 1 クラスターに含まれるなど用途や育成地の違いによってクラスターが分けられる傾向が一部みられた．系譜で見ると，低アミロース系統の中でも，西海 168 号由来のイワイノダイチと春のかがやきが 1 つのクラスターに含まれ，関東 107 号由来の品種は B クラスターに分類された．関東 107 号と西海 168 号の組合せであるあやひか



第8図 RAPDマーカーによる多型情報を基にしたコムギ品種間のクラスター分析結果.

りはイワイノダイチ，春のかがやきとやや離れた A クラスターに分類された．硬質粒品種についても，タマイズミを除く 3 品種の親には北海道育成系統が用いられていた．B クラスターで最も遠くに位置したしゅんようは東北農業試験場育成系統を用いていた．水田・吉田（1996b）は，西海系統 16 品種相互間の近縁係数に基づいてクラスター分析を行い，3 つの群に分類でき，それぞれの群で特徴的な系譜的關係がみられたと述べている．また，それらの群は品質や耐病性などの特性を持っているとしている．今回の結果から，DNA マーカーからでも近縁係数と同様に用途や育成地がある程度分類できる傾向があり，系譜を考慮するとよりの確な分類ができることが示唆された．

小麦農林 61 号は収集した県の間で多型がみられ，3 つのクラスターに分けられた．水稻では，川島・勝股（1961）がハウネンワセ，コシヒカリおよびたかね錦を用いた純系維持のための研究を実施し，その中でこれらの普及に移されている品種でも完全に固定はしておらず，そのため，二次選抜も必要であることを明らかにしている．また，畠山ら（注：昭和 60 年度千葉県原種農場試験成績書）は 22 県からコシヒカリを収集し特性を調査し，穂長，着粒数，出穂期等で地域的に異なる傾向がみられたとしている．小麦では西尾ら（1973）が奨励品種としている各県から小麦農林 61 号の種子を取り寄せ，採種地の相違と形質変異との関係を検討している．その結果，主成分分析による系統分類に関与した形質に出穂期，千粒重および 1 株穂数があり，1 ～ 2 の形質について表現型および遺伝子型に差異を認めたが，その変異は微働遺伝子による範囲内であるとしている．小麦農林 61 号は育成地である佐賀県では 1995 年に奨励品種から廃止した．そこで，供試した各県の原々種や原種の維持は長期間に渡り各県独自に行われており，異なる地域と方法で選抜・淘汰されてきたと考えられる．西尾ら（1973）によると，各県の原々種導入経路は千葉県が 1953 年に九州農業試験場から，東京都が 1954 年に埼玉県から入手した以外は，年度は異なるものの佐賀県から直接入手している．埼玉県が 1947 年，福岡県が 1948 年，静岡県と栃木県が 1952 年，群馬県が 1953 年，茨城県が 1956 年であり，DNA マーカーを用いて分類した 3 つのクラスターの分類との関係はみられない．西尾ら（1973）が述

べているように、単に導入先の違いだけではなく、採種地の自然的条件や原種の取扱い方法などの違いも含めて関連性を考える必要がある。RAPD 分析は遺伝子レベルではなく塩基レベルの変異を利用しているので、この多型が直ちに表現型に反映するとは限らない。しかし、県間で DNA マーカーに多型が現れたことは西尾ら（1973）の結果を DNA レベルでも裏付けていると考えられる。厳密に品種の定義を考えた場合に特性が均一であることが条件の一つであることから、原々種や原種生産の際に DNA マーカーを用いた変異のチェックも必要になってくる。また、イネのゲノムが解読され他のイネ科作物等へのマーカー開発のための利用が試みられている。CAPS マーカーはこれらの遺伝子情報に基づいて作製されたものが多い（内村ら 2004a）。これらを利用することにより表現型に関連した DNA 領域の識別が可能になってくれば、単に変異を識別するだけではなくどのような変異が起きているか解明されることが考えられる。

以上の様に、クラスター分析の結果からでは、用途や育成地毎に特徴があり、まだ遺伝的多様性が残されていると推定される。

#### **4. オオムギ優良品種のクラスター分析による分類**

栃木県におけるオオムギの作付けはビール醸造用の二条オオムギと主に食用となる六条オオムギがある。近年の育成品種はコムギと同様、加工適性の向上を最も重要な育種目標としていることから交配母本の系譜が似通ってきており、麦種ごとに近縁度の高まっていることが懸念される。一方、スカイゴールデンのように、二条オオムギにも遺伝子を六条オオムギから導入している品種もある（谷口ら 2001）。今後、オオムギの育種を実施していくに当たり、二条オオムギや六条オオムギの品種間での、また、二条オオムギと六条オオムギの遺伝的関係を把握しておくことは、育種目標となる有用遺伝子の由来を知る手がかりとなり、効率的にそれらに関する遺伝子の集積を行い、新品種育成を図る情報となる。そこで、二・六条オオムギ品種間の遺伝的関係を調査するため、ユークリッド距離を用いたクラスター分析を試みた。



## 材料と方法

### (1) 供試品種

供試品種は前節のオオムギの優良品種識別で供試した，二条オオムギのミカモゴールドン，スカイゴールドン，あまぎ二条，なす二条，みょうぎ二条，タカホゴールドン，きぬか二条，はるな二条，関東二条 35 号，六条オオムギのシュンライ，東山皮 101 号，ミノリムギ，カシマムギ，マサカドムギ，さやかぜ，すずかぜ，ファイバースノウ，セツゲンモチ，および参考として裸ムギのイチバンボシの合計 19 品種である．交配の両親名，育成地などは第 4 表に示した．

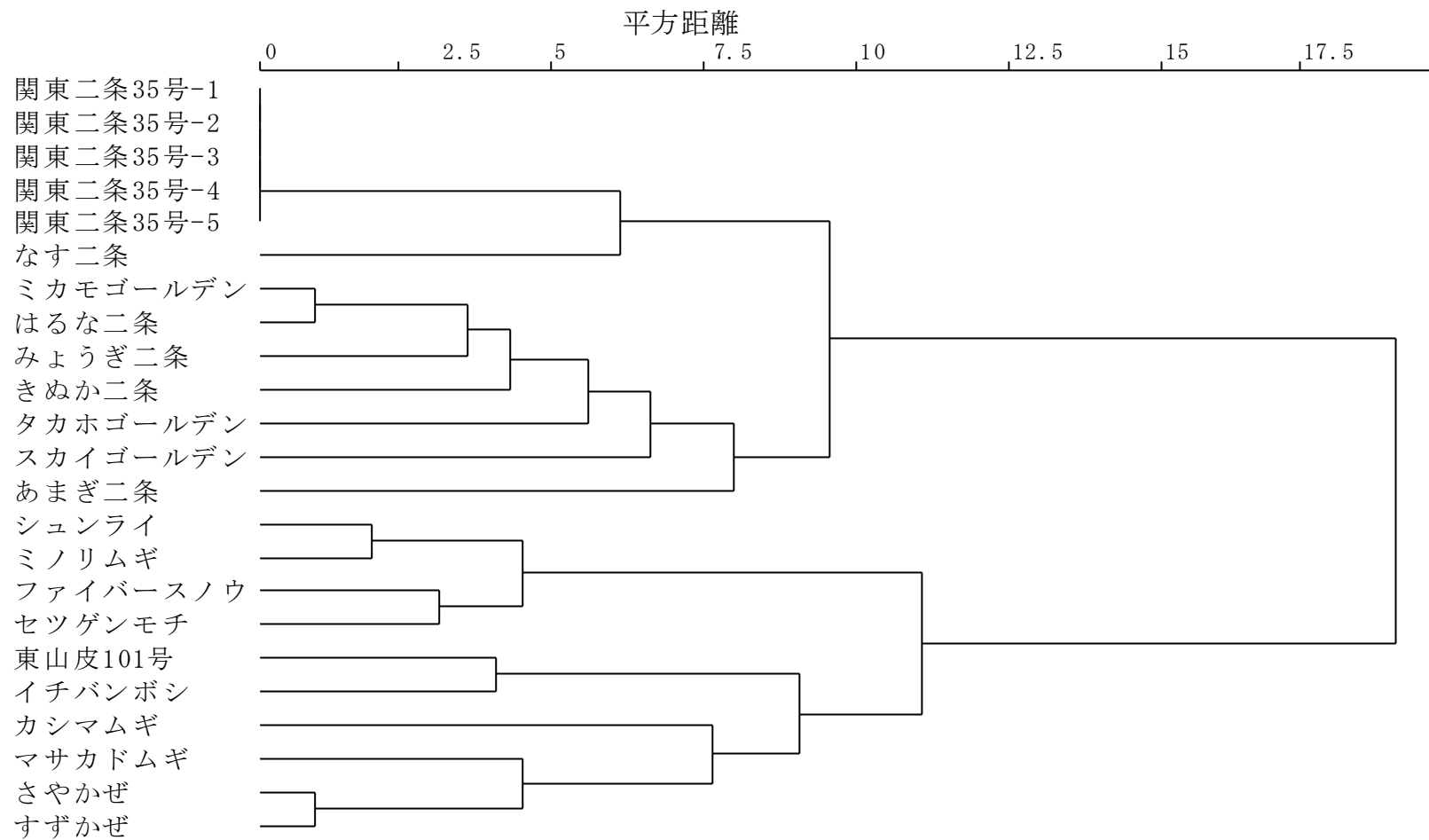
### (2) クラスター分析

コムギと同様な方法で，全品種について DNA 多型のデータ（第 7 表）を用いてクラスター分析を行った．

## 結 果

33 種類のマーカー（第 7 表）より計算したオオムギのクラスター分析の結果として得られたデンドログラムを第 9 図に示した．オオムギの品種は大きく 2 つのクラスターに分類された．二条オオムギと裸ムギを含む六条オオムギのクラスターである．二条オオムギのクラスターは関東二条 35 号およびなす二条とそれ以外の品種の 2 つのクラスターに分類された．関東二条 35 号は，系統間で多型がみられなかった．はるな二条を含むクラスターははるな二条と近縁度の高いクラスターで，最も遠くに由来の異なるあまぎ二条が位置した．六条オオムギのクラスターは大きく 3 つのクラスターに分類された．長野県農事試験場育成の品種のみからなるクラスター，東山 101 号とイチバンボシからなるクラスター，農業研究センター育成の品種からなるクラスターである．

## 考 察



第9図 RAPDマーカーによる多型情報を基にしたオオムギ品種間のクラスター分析結果.

オオムギのクラスター分析の結果では、二条オオムギと六条オオムギとに明確に分かれた。これは、二条オオムギは醸造用として、六条オオムギは精麦用として育成されていることから、遺伝的背景が異なるためと考えられる。六条オオムギの中でも長野県農事試験場と農業研究センターでクラスターが分かれているが、これは、長野県農事試験場は並性品種を、農業研究センターは渦性品種の育成を主に行っており、やはり遺伝的背景が異なっていることに起因すると思われた。この結果は裸ムギであるイチバンボシを除くと SSR 分析で解析した Turuspekov ら（2001）の結果と類似している。二条オオムギの関東二条 35 号は、雑種第 13 代であるが系統間で多型はみられなかった。

今後、固定度調査の中に今回のような DNA マーカーによるチェック体制を導入することの有効なことが判明したと考えられる。

## まとめ

栃木県産ムギ類の品質向上および原種、原々種の混種防止を目的に栃木県の奨励品種および有望視している品種を中心に関東周辺地域に作付けされているコムギ 17 品種、二条・六条・裸オオムギを含むオオムギ 19 品種について RAPD 分析による品種識別技術を開発した。これらの品種識別はコムギでは 5 種類のランダムプライマーを用いて DNA を増幅した後、1.5 % アガロースゲルで電気泳動しエチジウムブロマイド溶液で染色し、現れた 6 種類の DNA マーカーの多型を確認することで可能であった。オオムギでは 6 種類のランダムプライマーで現れた 9 種類の DNA マーカーの多型を確認することで可能であった。1945 年育成の古い品種である小麦農林 61 号は原種の採種地により多型が認められた。雑種第 13 世代の二条オオムギ関東二条 35 号の系統間に多型は認められず、固定しているものと考えられた。クラスター分析の結果からでは、コムギでは小麦農林 61 号を含むクラスターとそれ以外のクラスターの 2 つに、オオムギでは二条オオムギと六条オオムギとの 2 つのクラスターに明確に分類できた。用途や育成地毎に特徴があり、まだ遺伝的多様性が残されていると推定される。

#### 第4章 コムギおよびオオムギにおける近縁係数と遺伝的距離との関係

遺伝的背景を把握する方法としては、交配親となる品種間の近縁係数や遺伝的距離の解析が挙げられる。近縁係数は、品種の系譜図を基にして共通な祖先品種から統計的に算出する手法である。近縁係数の算出はコムギ（水田・吉田 1996b）およびビールオオムギ品種（水田ら 1996a）では系譜図のデータベースが入力されている推論型コンピュータ言語の Prolog を用いることにより、迅速かつ簡単にできるようになっている。さらに、このプログラムおよびこれを利用したデータベースは従来 MS - DOS 上での処理系で実施していたが、現在では吉田（2004）により Windows 上で作動させられるようになった。このプログラムによる近縁係数の算出方法は、両親の遺伝物質を雑種が半分ずつ受け継ぐとの仮定をして計算を行うものである。

遺伝的距離は、分子マーカーなどを指標とした集団間の差から多次元空間における距離を求め、遺伝的相似度を算出する方法である。Smile ら（2002）はコムギを用いて遺伝的距離と品種の系譜図からみた祖先の共通な割合とを比較し、良く一致したと報告している。また、内村ら（2004b）は国内の二条オオムギ 22 品種を用い、近縁係数と分子マーカーにより算出した遺伝的距離との関係を解析し、現在、これらの関係には有意な相関を認めている。

そこで、本章ではコムギおよびオオムギについて、育種の効率化のために遺伝的背景を把握する方法について検討した。前章で用いた栃木県を中心とした関東周辺地域におけるムギ類優良品種について、交配記録の系譜から統計的に近縁係数を算出した。次に簡単に品種間での違いを把握するため、RAPD 分析のデータから品種間で同一のバンドを示した DNA マーカー数（以下、同一マーカー数と記す）を計算した。さらに品種間のマーカーの多型から根井の遺伝的距離  $D$ （根井 2002）（以下、遺伝的距離  $D$  と記す）を算出した。これら、同一マーカー数と遺伝的距離  $D$  で近縁係数がどの程度説明できるかも検討

した.

## 1. コムギの近縁係数と遺伝的距離との関係

本節では、コムギについて遺伝的背景を把握するため、交配記録の系譜から統計的に近縁係数、次に簡単に品種間での違いを把握するため、RAPD 分析で得られた品種間で同一のバンドを示した DNA マーカー数、さらに品種間の距離の尺度を比較可能にして、より普遍化するためにマーカーの多型から根井の遺伝的距離  $D$  を算出した。これら、相互間の関係も検討した。

### 材料と方法

#### (1) 供試品種

品種は前章のコムギの優良品種識別で供試した、小麦農林 61 号，イワイノダイチ，タマイズミ，春のかがやき，きぬの波，つるびかり，ダブル 8 号，シラネコムギ，あやひかり，小麦農林 26 号，キヌヒメ，ユメセイキ，フウセツ，しゅんよう，ユメアサヒ，バンドウワセ，およびニシノカオリの合計 17 品種である。交配の両親名，育成地などは第 3 表に示した。

#### (2) 同一マーカー数

DNA 多型のデータは供試したコムギ 17 品種間について，RAPD マーカーにより検出した 23 種類の DNA 多型で，PCR 増幅産物がある，つまり，品種にその DNA マーカーが現れた場合を“1”，現れない場合を“0”とした（第 4 表）。ある 1 品種と他の 1 品種で同じく現れた DNA マーカーの数を同一マーカーとしてすべての品種相互間で計算した。17 品種相互間なので合計 136 組合せについての計算を行った。品種間の同一マーカー数は Visual Basic でプログラムを作成して算出した。

#### (3) 遺伝的距離

品種間の遺伝的距離  $D$  を以下の式で算出した．なお，算出に用いた品種の遺伝子頻度の値は同一マーカー数に用いたデータと同一である．

$$D = -\ln [\sum p_{1i} \times p_{2i}] / \sqrt{[(\sum p_{1i}^2) \times (\sum p_{2i}^2)]}$$

ここで， $p_{1i}$ ； 集団 1（品種 1）の  $i$  遺伝子座の遺伝子型の頻度， $p_{2i}$ ； 集団 2（品種 2）の  $i$  遺伝子座の遺伝子型の頻度である．計算には，Felsenstein によるプログラム（注：PHYLIP <http://evolution.gs.washington.edu/phyliip.html>）を用いて行った．

#### (4) 近縁係数

自殖作物の 2 個体  $X$ ， $Y$  間の近縁係数， $r_{XY}$ ，は 2 個体間の共通祖先を  $Z$  とし， $n_1$ ， $n_2$  を  $X$ ， $Y$  からそれぞれ  $Z$  へさかのぼる世代数とすると，

$$r_{XY} = \sum (1/2)^{n_1 + n_2}$$

で求められる（酒井 1957）．ここで  $\sum$  は共通祖先へさかのぼる全経路の和を示す．

近縁係数の算出は，水田ら（1996a）が作成した推論型コンピュータ言語の Prolog を用いたコムギのデータベースに近年のデータを付け加えて，Windows 版のプログラムによって行った．突然変異系統，純系淘汰品種，変種は原品種と同一として計算した．古い品種の記録の若干の相違は計算結果に大差をもたらさないことが確認されている（吉田 1999）．近縁係数と，同一マーカー数や遺伝的距離  $D$  との相関係数を計算した．

## 結 果

同一マーカーの算出結果を第 9 表に示した．同一マーカー数が 23 の内の 20 を上回っている組合せは，イワイノダイチと春のかがやきおよびあやひかり，タマイズミとあやひかりおよびキヌヒメ，春のかがやきとあやひかり，あやひかりとキヌヒメであり，品質特性が類似している品種は同一マーカー数が多い傾向であった．また，これらの 5 品種は前章のコムギ優良品種のクラスター分析による分類でも，デンドログラムにおいて 1 つのクラスターを形成しており，同一マーカー数とクラスターの結果は同様の傾向を示した．イワイノダイチ，春のかがやき，およびあやひかりは共通の親として西海 168 号（後の

第9表 コムギ品種間における同一マーカース数.

No.	品種名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	小麦農林61号																	
2	イワイノダイチ	17																
3	タマイズミ	17	19															
4	春のかがやき	16	22	18														
5	きぬの波	13	15	17	14													
6	つるぴかり	13	17	19	18	15												
7	ダブル8号	9	13	13	14	13	17											
8	シラネコムギ	14	14	14	15	14	18	18										
9	あやひかり	17	21	21	20	17	17	11	12									
10	小麦農林26号	12	18	14	17	16	14	14	15	16								
11	キヌヒメ	19	19	21	18	17	17	11	14	21	14							
12	ユメセイキ	11	15	15	14	17	13	13	14	15	18	13						
13	フウセツ	12	16	14	17	14	16	14	15	16	19	14	14					
14	しゅんよう	10	10	12	11	12	14	14	15	10	13	10	12	15				
15	ユメアサヒ	13	13	11	12	15	13	17	18	11	14	13	13	12	10			
16	バンドウワセ	18	18	16	19	14	16	12	15	16	13	18	12	15	11	14		
17	ニシノカオリ	13	13	13	12	11	11	17	14	13	14	11	15	14	14	15	10	
同一マーカース数平均		14.0	16.3	15.9	16.1	14.6	15.5	13.8	14.9	15.9	15.1	15.6	14.0	14.8	12.1	13.4	14.8	13.1

マーカース数は全部で23個.

きぬいろは)が使われていた。硬質粒品種であるタマイズミとそうでないあやひかりおよびキヌヒメ間で同一マーカーが多い原因は明らかではなかったが、系譜図を遡ると各育成地の品種が交配に使用されているためと考えられる。そこで、同一マーカー数と近縁係数との関係について第 10 図に示した。全品種相互間での相関係数は  $r = 0.518$  と 1 %水準で有意であった。秋播性程度の高い系統“秋 9”を交配親に用いたイワイノダイチと他品種の組合せに限った場合の相関係数は、 $r = 0.904$  と高くなった。

遺伝的距離  $D$  の計算結果を第 10 表に示した。遺伝的距離  $D$  の結果では、計算結果が 0.1 以下と遺伝的距離  $D$  が近いと示されたのはイワイノダイチと春のかがやきおよびあやひかり、タマイズミとあやひかりおよびキヌヒメであった。また、次いで 0.14 と近かったのは春のかがやきとあやひかりであった。これらは同一マーカー数から得た結果とほぼ同様の傾向であった。品種間の近縁係数は 0.02 から 0.75 に分布していたが、ダブル 8 号とシラネコムギ間で 0.75、春のかがやきとバンドウワセ間で 0.69 と高かった以外は 0.6 以下であった (第 10 表)。

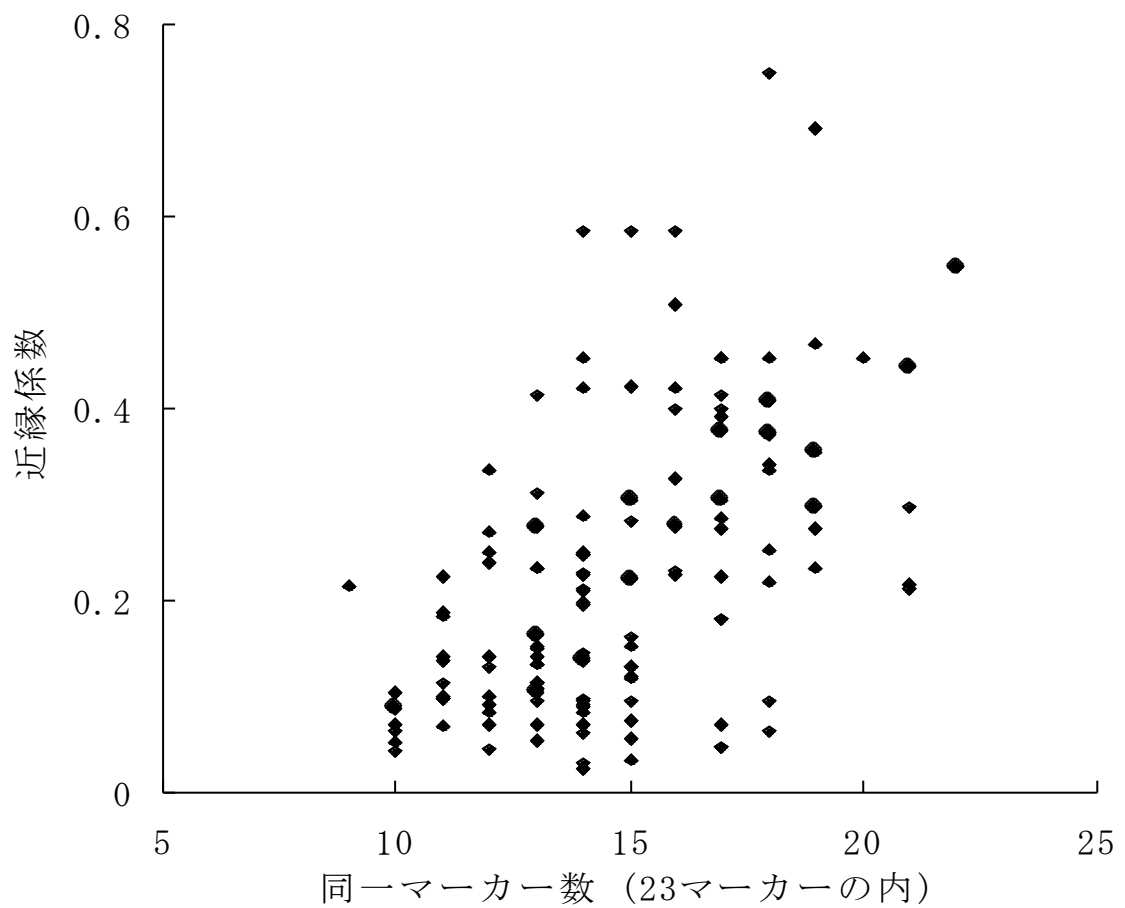
近縁係数と遺伝的距離  $D$  との相関係数を求めた (第 10 表, 第 11 図)。全品種相互間の組合せによる場合では、 $r = -0.511$  で 1 %水準の有意な相関が認められた。イワイノダイチと他品種間の組合せに限った場合の相関係数は、 $r = -0.892$  で 1 %水準で有意であり、相関係数の値が高くなった。

## 考 察

品種間多型の現れたコムギ品種について、同一マーカー数、遺伝的距離  $D$  および近縁係数を計算した。どの値も系譜、育成地、交配親などを良く反映し、品種間の類似性も同様の傾向を示し、前章のコムギ優良品種のクラスター分析による分類の結果と概ね一致した。

全品種相互間での同一マーカー数と近縁係数との間には有意な相関関係がみられた。さらに、イワイノダイチと他品種間の組合せに限った場合の相関係数はさらに高くなった。



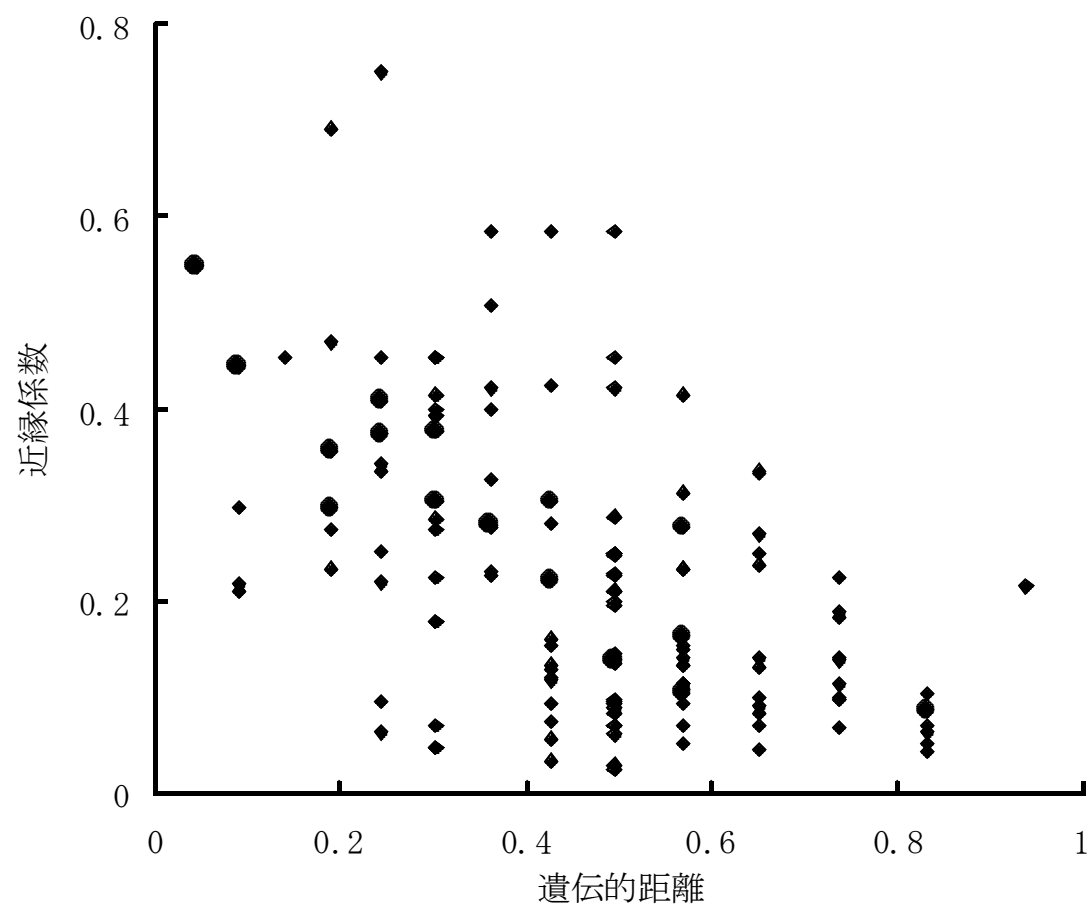


第 1 0 図 コムギ品種間の同一マーカー数と近縁係数の関係.

全品種間での相関は  $r = 0.518$ . ●印のイワイノダイ  
チとの間の相関は  $r = 0.904$ .

第10表 コムギ品種における遺伝的距離D（右上）と近縁係数（左下）の値.

品種名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 小麦農林61号		0.30	0.30	0.36	0.57	0.57	0.94	0.50	0.30	0.65	0.19	0.74	0.65	0.83	0.57	0.25	0.57
2 イワイノダイチ	0.38		0.19	0.04	0.43	0.30	0.57	0.50	0.09	0.25	0.19	0.43	0.36	0.83	0.57	0.25	0.57
3 タマイズミ	0.39	0.30		0.25	0.30	0.19	0.57	0.50	0.09	0.50	0.09	0.43	0.50	0.65	0.74	0.36	0.57
4 春のかがやき	0.33	0.55	0.34		0.50	0.25	0.50	0.43	0.14	0.30	0.25	0.50	0.30	0.74	0.65	0.19	0.65
5 きぬの波	0.23	0.30	0.27	0.45		0.43	0.57	0.50	0.30	0.36	0.30	0.30	0.50	0.65	0.43	0.50	0.74
6 つるぴかり	0.23	0.30	0.27	0.45	0.58		0.30	0.25	0.30	0.50	0.30	0.57	0.36	0.50	0.57	0.36	0.74
7 ダブル8号	0.22	0.10	0.11	0.10	0.07	0.07		0.25	0.74	0.50	0.74	0.57	0.50	0.50	0.30	0.65	0.30
8 シラネコムギ	0.29	0.14	0.14	0.13	0.09	0.09	0.75		0.65	0.43	0.50	0.50	0.43	0.43	0.25	0.43	0.50
9 あやひかり	0.22	0.44	0.22	0.45	0.45	0.45	0.07	0.09		0.36	0.09	0.43	0.36	0.83	0.74	0.36	0.57
10 小麦農林26号	0.25	0.37	0.25	0.40	0.42	0.42	0.07	0.09	0.51		0.50	0.25	0.19	0.57	0.50	0.57	0.50
11 キヌヒメ	0.47	0.35	0.30	0.25	0.18	0.18	0.19	0.25	0.21	0.23		0.57	0.50	0.83	0.57	0.25	0.74
12 ユメセイキ	0.18	0.22	0.16	0.25	0.41	0.41	0.05	0.07	0.42	0.38	0.14		0.50	0.65	0.57	0.65	0.43
13 フウセツ	0.34	0.28	0.21	0.29	0.23	0.23	0.09	0.12	0.23	0.23	0.21	0.25		0.43	0.65	0.43	0.50
14 しゅんよう	0.06	0.09	0.07	0.10	0.08	0.08	0.02	0.03	0.07	0.09	0.05	0.05	0.06		0.83	0.74	0.50
15 東山38号	0.15	0.28	0.14	0.27	0.15	0.15	0.05	0.06	0.22	0.19	0.13	0.11	0.13	0.04		0.50	0.43
16 バンドウワセ	0.34	0.41	0.40	0.69	0.58	0.58	0.10	0.13	0.28	0.31	0.22	0.24	0.28	0.11	0.20		0.83
17 ニシノカオリ	0.11	0.16	0.11	0.14	0.10	0.10	0.05	0.06	0.13	0.14	0.14	0.07	0.09	0.03	0.12	0.10	
遺伝的距離平均	0.52	0.37	0.39	0.38	0.46	0.41	0.53	0.44	0.40	0.43	0.41	0.50	0.45	0.66	0.55	0.46	0.57
近縁係数平均	0.26	0.29	0.23	0.32	0.29	0.29	0.13	0.16	0.28	0.27	0.22	0.21	0.20	0.07	0.15	0.31	0.10
両者間の相関係数	0.71	0.89	0.68	0.72	0.46	0.15	0.20	0.35	0.60	0.43	0.68	0.47	0.15	0.34	0.27	0.60	0.41



第 1 1 図 コムギ品種間の遺传的距離Dと近縁係数との関係.  
 全品種間での相関は $r=-0.511$ , ●印のイワイノダイチとの間の相関  
 は $r=-0.892$ .

次に、近縁係数と遺伝的距離との関係も同一マーカーの場合と同様で、全品種間で、 $r = -0.511$  の有意な相関が認められた。イワイノダイチの他品種との相関係数は最も高く、 $r = -0.892$  であった（第 11 図）。図中で、DNA 多型の検出率からみて遺伝的相似度が高く遺伝的距離が近いにもかかわらず交配記録による系譜上では類縁関係があまり無い場合は、全体の傾向の左下に位置するはずである。逆に、DNA 多型の検出率からみて遺伝的相似度が低く遺伝的距離が遠いにもかかわらず系譜上では互いに共通な交配親が多く使われていたり、なんらかの誤りで系譜内に共通親が記載されてしまった場合には、図の右上に位置する。図では全体的に左下に分布する傾向が認められた。この原因としては、低アミロースや製パン用の硬質粒品種が交配親として入ってきており、これらが交配記録上では類縁関係がないが、遺伝的背景からみると前述の形質以外は従来の育種目標であるため、共通している遺伝子領域が多いため、あるいは硬質粒品種の祖先は系譜上不明となったが実際は他の品種と同様な祖先を持っているためと考えられる。

このように一部の不整合性はあるにせよ、系譜上の類縁関係から計算した近縁係数は同一の DNA マーカー数や、遺伝的距離と有意な相関関係が認められた。

なお、遺伝的距離  $D$  と同一マーカー数との関係をみるため、両者の相関を第 11 表に示した。コムギでの相関係数は  $r = -0.993$  から  $-0.999$  に分布し、全体でも  $r = -0.993$  と極めて高かった。根井による遺伝的距離  $D$  は品種相互間の距離の尺度として単なる同一マーカー数より普遍的ではあるが、ここでの結果は、単にマーカーが同一であるかどうかを数えるのみでも、品種相互間の遺伝的な違いを推定するのに有効であることを示している。

本論文の結果は近縁係数が同一マーカー数や DNA マーカーから算出した遺伝的距離  $D$  からある程度の裏付けがなされ、今回 DNA マーカーで検出した多型が存在する染色体領域は、品種育成の過程の選抜や淘汰により大きく偏ることなく、後代にほぼ均等に分離していたことを示している。

クラスター分析の結果からでは、用途や育成地毎に特徴があり、まだ遺伝的多様性が残

第11表 コムギ品種における遺伝的距離Dと同一マーカーの関係.

品種名	遺伝的距離平均	同一マーカー平均	相関係数
小麦農林61号	0.518	14.0	-0.994
イワイノダイチ	0.367	16.3	-0.993
タマイズミ	0.389	15.9	-0.996
春のかがやき	0.377	16.1	-0.995
きぬの波	0.461	14.6	-0.998
つるぴかり	0.405	15.5	-0.997
ダブル8号	0.530	13.8	-0.994
シラネコムギ	0.437	14.9	-0.998
あやひかり	0.398	15.9	-0.994
小麦農林26号	0.432	15.1	-0.998
キヌヒメ	0.412	15.6	-0.995
ユメセイキ	0.504	14.0	-0.997
フウセツ	0.446	14.8	-0.997
しゅんよう	0.657	12.1	-0.999
ユメアサヒ	0.554	13.4	-0.995
バンドウワセ	0.457	14.8	-0.996
ニシノカオリ	0.570	13.1	-0.997
全体			-0.993

遺伝的距離平均はある品種と他の16品種の遺伝的距離の平均値.

同一マーカー平均はある品種と他の16品種の同一マーカー数の平均値, マーカー数は全部で23個.

相関係数は遺伝的距離平均と同一マーカー平均との相関係数.

されている。また、大里・吉田（1996）によれば、水稻で福岡県農業総合試験場育成系統を供試し、コシヒカリを祖先に持つ系統とコシヒカリとの近縁係数を算出し、0.404 から 0.783 に分布したとしている。今回最も高い近縁係数を示したのは、コムギでは春のかがやきで 0.10 から 0.69 であった。その値は水稻と比較するとまだ低い値であり、まだ遺伝的多様性が残されていると思われる。現状では品種間の遺伝的背景の違いは近縁係数の計算で比較的簡単に推定可能であるとともに、一方では近縁係数が高まってくることが予想され、分子マーカーによる同一マーカー数や遺伝的距離  $D$  の推定も重要になってくると思われる。今後、分子育種の発展にともない、RAPD 分析だけではなく、遺伝情報が明らかになっている制限酵素サイトを利用する AFLP 分析や CAPS 分析、および有用遺伝子に連鎖した SSR 分析等も考えられる。

以上のことから、近縁程度を求めるには DNA マーカー利用も重要であるが、近縁係数による簡易な血縁関係の推定も有効であることを示している。さらに、同一マーカー数の利用も簡単な血縁関係の推定方法として利用できると考えられる。気象変動、栽培法の改良等に対応するためにリスク分散を図るうえで、遺伝的な多様性の維持を意識しながら品種育成を実施するためにも、近縁係数のみならず、分子マーカーから算出した遺伝的距離  $D$  および同一マーカー数の有効な利用が必要と考えられた。

現在、すべての育種機関で分子マーカーを利用できる体制ではないが、育種者の利便性を考慮し、上記いずれかの方法を交配計画に取り入れることにより育種の効率化が図れると思われる。

## 2. オオムギの近縁係数と遺伝的距離との関係

本節では、コムギと同様の方法を用いてオオムギについて、交配記録の系譜から統計的に近縁係数を算出し、次に、簡単に品種間での違いを把握するため、品種間で同一のバンドを示した同一マーカー数を計算した。さらに、品種間の距離の尺度を比較可能にして、

より普遍化するためにマーカーの多型から遺伝的距離  $D$  を算出した。これら、同一マーカー数と遺伝的距離  $D$  で近縁係数がどの程度説明できるかも検討した。

## 材料と方法

### (1) 供試品種

品種は前章のオオムギの優良品種識別で供試した、二条オオムギのミカモゴールドデン、スカイゴールドデン、あまぎ二条、なす二条、みょうぎ二条、タカホゴールドデン、きぬか二条、はるな二条、および関東二条 35 号、六条オオムギのシュンライ、東山皮 101 号、ミノリムギ、カシマムギ、マサカドムギ、さやかぜ、すずかぜ、ファイバースノウ、セツゲンモチ、および裸ムギのイチバンボシの合計 19 品種である。交配の両親名、育成地等は第 6 表に示した。

### (2) 同一マーカー数

DNA 多型のデータは供試した 19 品種間について、RAPD マーカーにより検出した 33 種類の DNA 多型で、PCR 増幅産物がある、つまり、品種にその DNA マーカーが現れた場合を“1”，現れない場合を“0”とした（第 7 表）。ある 1 品種と他の 1 品種で同じく現れた DNA マーカーの数を同一マーカーとしてすべての品種相互間で計算した 171 組合せである。

### (3) 遺伝的距離および近縁係数

コムギと同じ方法を用いた。

## 結 果

同一マーカーの算出結果を第 12 表に示した。品質や形態的特性が類似している品種では同一マーカー数が多かった。特に、二条オオムギと六条オオムギでは明らかに差異がみられた。二条オオムギ間では同一マーカー数は 33 の内の 23 から 30 であり、六条オオムギ間でも 18 から 30 であった。それに対し、二条オオムギと六条オオムギ間では 6 から 20

第12表 オオムギ品種間における同一マーカール数.

No.	品種名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	関東二条35号																			
2	ミカモゴールドン	25																		
3	スカイゴールドン	23	27																	
4	あまぎ二条	23	27	23																
5	なす二条	27	27	23	23															
6	みょうぎ二条	23	29	27	23	25														
7	タカホゴールドン	21	27	25	23	23	29													
8	きぬか二条	23	29	25	27	25	27	25												
9	はるな二条	24	32	28	26	28	30	28	30											
10	シュンライ	11	13	17	13	13	15	15	17	14										
11	東山皮101号	18	14	18	14	20	16	16	16	15	22									
12	ミノリムギ	13	15	19	15	15	17	17	19	16	31	24								
13	カシマムギ	10	10	14	12	12	14	16	12	11	22	25	24							
14	マサカドムギ	12	10	14	6	14	12	16	8	11	18	23	18	25						
15	さやかぜ	14	10	14	8	16	12	14	10	11	20	25	20	25	29					
16	すずかぜ	13	9	13	7	15	13	13	9	10	21	24	21	26	28	32				
17	ファイバースノウ	14	12	16	12	16	14	14	16	13	28	27	28	23	21	23	24			
18	セツゲンモチ	13	15	19	15	15	17	15	19	16	29	26	29	24	18	20	21	30		
19	イチバンボシ	18	14	18	14	20	16	18	14	15	18	29	20	23	23	25	24	23	22	
同一マーカール数平均		18.1	18.1	20.2	17.3	19.8	19.9	19.7	19.5	19.9	18.7	20.7	20.1	18.2	17.0	18.2	17.9	19.7	20.2	19.7

マーカール数は全部で 33 個.



であり 10 以下の組合せも多くみられた。裸ムギであるイチバンボシは六条であり、六条オオムギとの同一マーカー数が多かった。クラスター分析の結果でも、デンドログラムにおいて二条オオムギと六条オオムギは大きな 2 つのクラスターに分かれており、今回の結果と一致していた。

同一マーカー数と近縁係数との関係について第 12 図に示した。オオムギ全品種相互間での相関係数は  $r = 0.731$  と 1 %水準で有意であった。六条オオムギを祖先に持つスカイゴールデンと他品種間の組合せでの相関係数は、 $r = 0.805$  と高くなった。

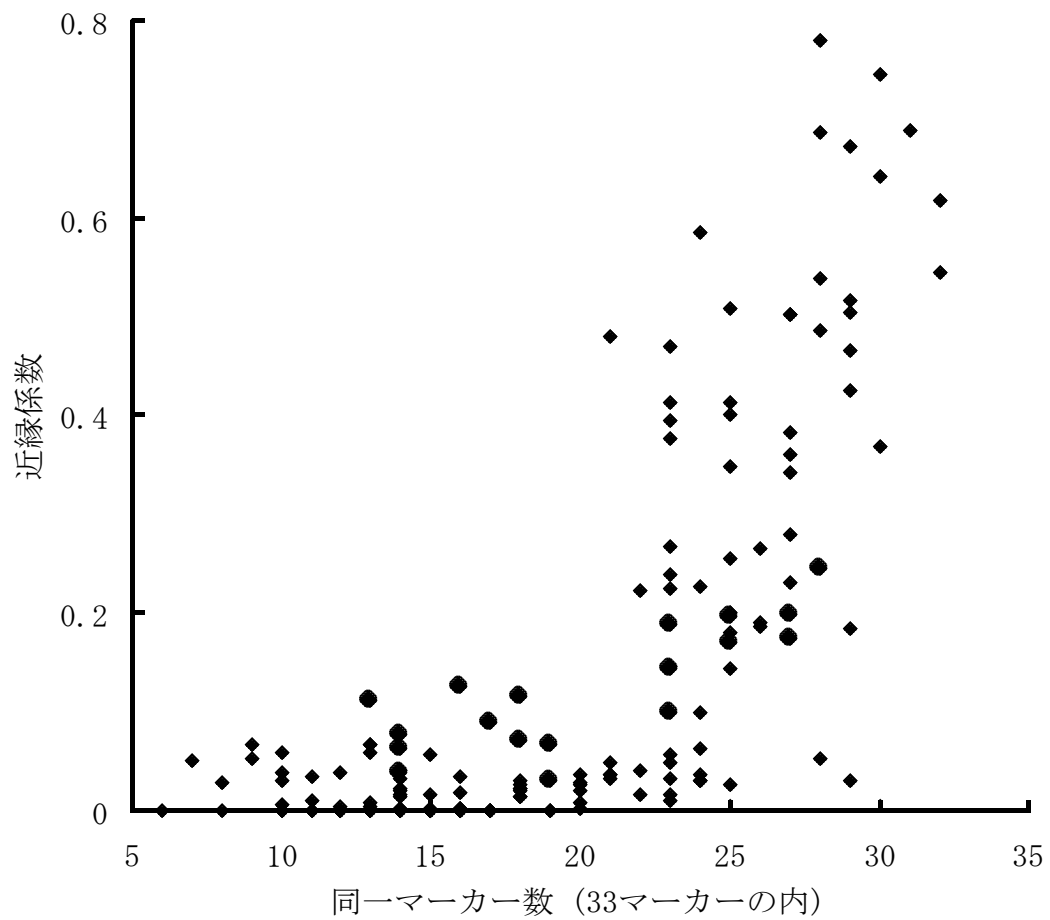
遺伝的距離  $D$  の計算結果を第 13 表に示した。二条オオムギ品種間では 0.03 ～ 0.45、六条オオムギ品種間では 0.03 ～ 0.61 であるのに対し、二条オオムギ品種と六条オオムギ品種間では 0.50 ～ 1.19 と遺伝距離  $D$  は遠くなった。これらは同一マーカー数から得た結果とほぼ同様の傾向であった。

近縁係数は、全品種間では 0.10 から 0.78 とコムギや六条オオムギよりも高い傾向がみられた（第 13 表）。特に、はるな二条ではミカモゴールデンとの間で 0.62、みょうぎ二条との間では 0.75、きぬか二条とでは 0.78 と高い近縁係数がみられた。六条オオムギの品種間での近縁係数は 0.02 から 0.69 であった。シュンライとミノリムギおよびファイバースノウでいずれも 0.69 と高かったが、他はほとんどが 0.50 以下であった。二条オオムギ品種と六条オオムギ品種間の近縁係数は 0.00 から 0.13 と低かった。

近縁係数と遺伝的距離  $D$  との相関係数を求めた。計算結果を第 13 表および第 13 図に示した。全品種相互間の組み合わせでの場合は、 $r = -0.659$  で 1 %水準の有意な相関が認められた。スカイゴールデンと他品種間の組み合わせでの相関係数は、 $r = -0.770$  であった。図ではコムギの傾向と異なり、 $X$  軸に沿って分布したものの多い傾向であった。

## 考 察

品種間多型の現れたオオムギにおいて、同一マーカー数、遺伝的距離  $D$  および近縁係数を計算した。どの値も系譜、育成地、交配親などを良く反映し、品種間の類似性も同様

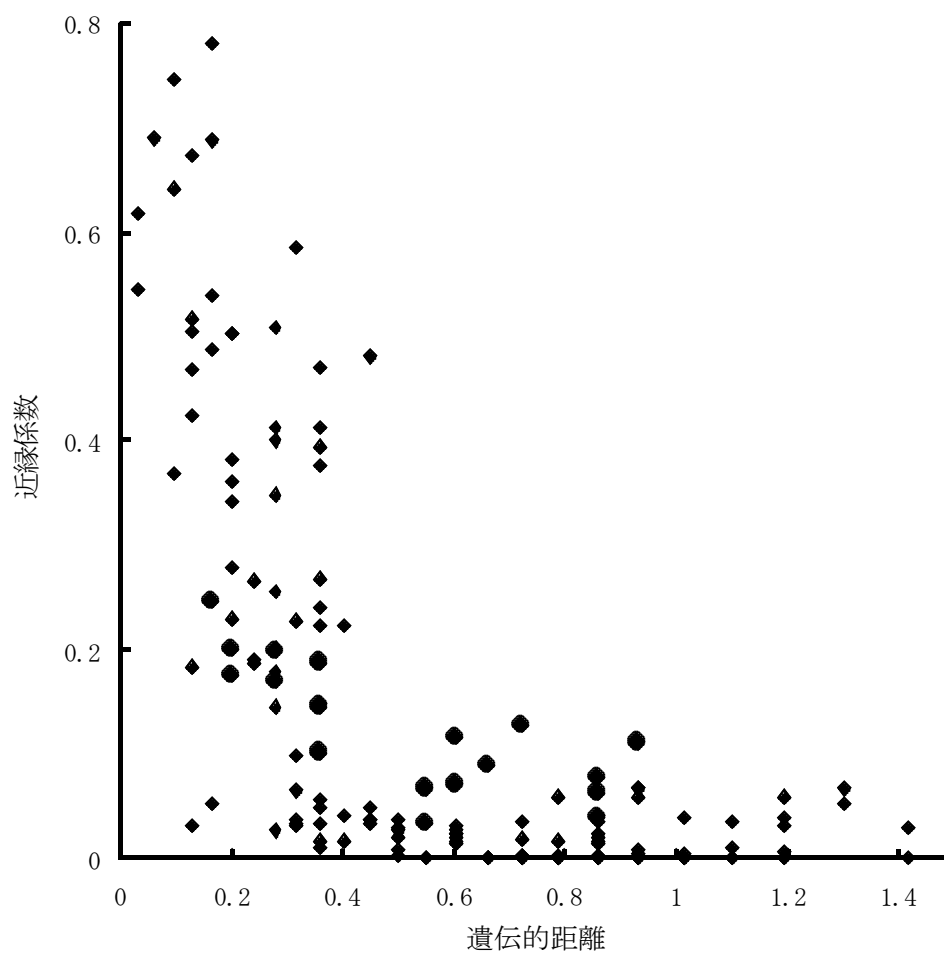


第 1 2 図 オオムギ品種間の同一マーカー数と近縁係数の関係.

全品種での相関は  $r = 0.731$ . ●印のスカイゴールデンとの間の相関は  $r = 0.805$ .

第13表 オオムギ品種における遺伝的距離D（右上）と近縁係数（左下）の値.

品種名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1 関東二条35号		0.28	0.36	0.36	0.20	0.36	0.45	0.36	0.32	1.10	0.61	0.93	1.19	1.01	0.86	0.93	0.86	0.93	0.61
2 ミカモゴールドン	0.40		0.20	0.20	0.20	0.13	0.20	0.13	0.03	0.93	0.86	0.79	1.19	1.19	1.19	1.30	1.01	0.79	0.86
3 スカイゴールドン	0.19	0.17		0.36	0.36	0.20	0.28	0.28	0.16	0.66	0.61	0.55	0.86	0.86	0.86	0.93	0.72	0.55	0.61
4 あまぎ二条	0.38	0.23	0.10		0.36	0.36	0.36	0.20	0.24	0.93	0.86	0.79	1.01	1.70	1.42	1.55	1.01	0.79	0.86
5 なす二条	0.34	0.36	0.14	0.24		0.28	0.36	0.28	0.16	0.93	0.50	0.79	1.01	0.86	0.72	0.79	0.72	0.79	0.50
6 みょうぎ二条	0.47	0.50	0.20	0.27	0.41		0.13	0.20	0.10	0.79	0.72	0.66	0.86	1.01	1.01	0.93	0.86	0.66	0.72
7 タカホゴールドン	0.48	0.50	0.20	0.22	0.39	0.67		0.28	0.16	0.79	0.72	0.66	0.72	0.72	0.86	0.93	0.86	0.79	0.61
8 きぬか二条	0.41	0.47	0.17	0.28	0.35	0.50	0.51		0.10	0.66	0.72	0.55	1.01	1.42	1.19	1.30	0.72	0.55	0.86
9 はるな二条	0.59	0.62	0.24	0.27	0.49	0.75	0.78	0.64		0.86	0.79	0.72	1.10	1.10	1.10	1.19	0.93	0.72	0.79
10 シュンライ	0.01	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.41	0.06	0.41	0.61	0.50	0.45	0.16	0.13	0.61
11 東山101号	0.01	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.22		0.32	0.28	0.36	0.28	0.32	0.20	0.24	0.13
12 ミノリムギ	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.69	0.23		0.32	0.61	0.50	0.45	0.16	0.13	0.50
13 カシマムギ	0.01	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.26	0.03		0.28	0.28	0.24	0.36	0.32	0.36
14 マサカドムギ	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.15	0.02	0.18		0.13	0.16	0.45	0.61	0.36
15 さやかぜ	0.04	0.04	0.08	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.14	0.03	0.20	0.18		0.03	0.36	0.50	0.28
16 すずかぜ	0.07	0.07	0.11	0.05	0.06	0.07	0.06	0.05	0.06	0.05	0.10	0.03	0.19	0.05	0.54		0.32	0.45	0.32
17 ファイバースノウ	0.01	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.69	0.38	0.54	0.06	0.04	0.05	0.06		0.10	0.36
18 セツゲンモチ	0.01	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.42	0.19	0.52	0.03	0.02	0.03	0.04	0.37		0.41
19 イチバンボシ	0.03	0.02	0.07	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.01	0.02	0.01	0.03	0.04	0.03	0.02	
遺伝的距離平均	0.62	0.60	0.50	0.70	0.52	0.53	0.52	0.57	0.56	0.58	0.47	0.50	0.62	0.71	0.64	0.66	0.54	0.50	0.51
近縁係数平均	0.19	0.19	0.12	0.12	0.16	0.22	0.21	0.19	0.25	0.13	0.10	0.12	0.06	0.04	0.09	0.09	0.13	0.09	0.02
両者間の相関係数	0.83	0.87	0.77	0.76	0.87	0.88	0.88	0.76	0.86	0.81	0.71	0.83	0.67	0.66	0.58	0.41	0.72	0.81	0.12



第13図 オオムギ品種間の根井による遺伝的距離Dと近縁係数との関係.  
全品種間での相関は $r=-0.659$ , ●印のスカイゴールデンとの間の相  
関は $r=-0.770$ .

の傾向を示し、前章のオオムギ優良品種のクラスター分析による分類の結果と概ね一致した。

全品種相互間での同一マーカー数と近縁係数との間には、有意な相関関係がみられた。さらに、スカイゴールデンと他品種間の組合せに限った場合の相関係数はさらに高くなった。オオムギではコムギに比較して X 軸に偏る傾向があった。また近縁係数が 0 でもあるにもかかわらず同一マーカー数が 6 から 20 に並んでいる場合があったが、これは二条オオムギと六条オオムギで系譜図上では同じ祖先品種が無いが、共通の祖先が実際には存在していたことを示している。

次に、近縁係数と遺伝的距離 D との関係を見ると、全品種相互間での値の場合、 $r = -0.659$  の有意な相関が認められた (第 13 図)。スカイゴールデンは六条オオムギの耐病性を導入した二条オオムギ品種で、他品種と遺伝的背景が似通った部分があると考えられる。スカイゴールデンと他品種との組み合わせでの相関係数を見ると、 $r = -0.770$  と高い値であった。前述したとおり、オオムギの場合はコムギと異なり、X 軸に沿って分布している傾向がみられた。これは、DNA マーカーで推定した遺伝的距離が近いにもかかわらず、系譜上の類縁関係は近いものから遠いものまで分布していることを示している。系譜上では共通祖先のない二条オオムギと六条オオムギを一緒に比較しているためと考えられる。特に、ただ 1 つ供試した裸ムギであるイチバンボシの他品種との相関係数は  $r = -0.120$  と最も低くなっている。

このように一部の不整合性はあるにせよ、系譜上の類縁関係から計算した近縁係数は同一の DNA マーカー数や、遺伝的距離と有意な相関関係が認められた。

なお、遺伝的距離 D と同一マーカー数との関係をみるため、両者の相関を第 14 表に示した。オオムギでの相関係数はコムギよりやや低いが、 $r = -0.975$  から  $-0.996$  に分布し、全体でも  $r = -0.983$  と極めて高かった。根井による遺伝的距離 D は品種相互間の距離の尺度として単なる同一マーカー数より普遍的ではあるが、ここでの結果は、コムギと同様に単にマーカーが同一であるかどうかを数えるのみでも、品種相互間の遺伝的な違

第14表 オオギ品種における遺伝的距離Dと同一マーカーの関係.

品種名	遺伝的距離平均	同一マーカー平均	相関係数
関東二条35号	0.617	18.1	-0.994
ミカモゴールドン	0.605	18.1	-0.992
スカイゴールドン	0.495	20.2	-0.995
あまぎ二条	0.703	17.3	-0.979
なす二条	0.517	19.8	-0.995
みょうぎ二条	0.526	19.9	-0.995
タカホゴールドン	0.520	19.7	-0.996
きぬか二条	0.569	19.5	-0.985
はるな二条	0.557	19.9	-0.993
シュンライ	0.578	18.7	-0.989
東山皮101号	0.469	20.7	-0.996
ミノリムギ	0.500	20.1	-0.993
カシマムギ	0.621	18.2	-0.996
マサカドムギ	0.707	17.0	-0.975
さやかぜ	0.635	18.2	-0.984
すずかぜ	0.663	17.9	-0.983
ファイバースノウ	0.536	19.7	-0.994
セツゲンモチ	0.497	20.2	-0.994
イチバンボシ	0.512	19.7	-0.994
全体			-0.983

遺伝的距離平均はある品種と他の16品種の遺伝的距離の平均値.

同一マーカー平均はある品種と他の16品種の同一マーカー数の平均値, マーカー数は全部で23個.

相関係数は遺伝的距離平均と同一マーカー平均との相関係数.

いを推定するのに有効であることを示している.

本試験の結果はコムギと同じ様に、近縁係数が同一マーカー数や DNA マーカーから算出した遺伝的距離  $D$  からある程度の裏付けがなされ、今回 DNA マーカーで検出した多型が存在する染色体領域は、品種育成の過程の選抜や淘汰により大きく偏ることなく、後代にはほぼ均等に分離していったことを示している. 内村ら (2004b) が国内の二条オオムギ 22 品種で調査した結果でも近縁係数と遺伝的距離  $D$  の相関係数は  $r = -0.526$  であり、今回の結果はコムギや二条オオムギおよび六条オオムギを含めたオオムギ品種間でも同様な結果であることを示した.

前節のクラスター分析の結果からでは、用途や育成地毎に特徴があり、まだ遺伝的多様性が残されていると述べた. また、現状では品種間の遺伝的背景の違いは近縁係数の計算で比較的簡単に推定可能であるとともに、一方では近縁係数が高まってくることが予想され、また、二・六条オオムギ間の交配では近縁係数が 0 でも分子マーカーで関連性が認められることがある等から分子マーカーによる同一マーカー数や遺伝的距離  $D$  の推定も重要になってくると思われる.

内村ら (2004b) は二条オオムギ品種を材料とし、系譜図から計算した近縁係数と分子マーカーから推定した遺伝的距離の間に高い相関を認めている. また、片親を 1 品種に決定した場合にはさらに高い相関を認めた. 本論文の結果から、コムギおよびオオムギでも同様に高い相関があることを明らかにした. これは、本研究に供試した品種の系譜図が極めて正確であることも示している. 以上のことから、近縁程度を求めるには DNA マーカー利用も重要であるが、近縁係数による簡易な血縁関係の推定もコムギ、オオムギともに有効であることを示している. さらに、同一マーカー数の利用も簡単な血縁関係の推定方法として利用できると考えられる.

## まとめ

品種育成において、交配親を選定する際に遺伝的背景を把握しておくことは、育種の効

率化のために有効である。そこで、関東周辺地域のムギ類品種を用い、交配記録の系譜から統計的に近縁係数を算出した。次にこれらの品種間で RAPD 分析による同一のバンドを示す DNA マーカー数と根井の遺伝的距離  $D$  を算出した。同一のマーカー数と近縁係数の間の相関係数はコムギで 0.581 ~ 0.904, オオムギでは 0.731 ~ 0.805 であった。遺伝的距離と近縁係数の間の相関係数はコムギで - 0.511 ~ - 0.892, オオムギでは - 0.659 ~ - 0.770 であった。このことは、コムギ, オオムギにおいて今回の分子マーカーから得た遺伝情報は、育成の過程で後代にほぼ均等に分離していったことを示すと考えられた。遺伝情報を利用した DNA マーカーおよび近縁係数による簡易な血縁関係の推定は利用価値が高いと考えられる。なお, 同一マーカー数と遺伝的距離の相関係数は極めて高かった。遺伝的な多様性の維持を意識しながら品種育成するためにもこれらの情報の有効利用が必要と考えられた。



## 第5章 RAPD 分析によるユウガオ (*Lagenaria siceraria*) の品種分類

かんぴょうの原料となるユウガオは栃木県の特産作物の一つである。その歴史は古く諸説があるが、1712 年に江州（滋賀県）水口の城主であった鳥居伊賀守忠英が、下野国の壬生城に封ぜられてから栽培されるようになったというのが通説である（農山漁村文化協会 1989）。当時、特産が無かったため、ユウガオの種子を江州木津村から取り寄せて試作させたところ、結果が良好であったことから作付けが拡大したと記述されている。次いで、栃木県のユウガオを広く周知させたのは壬生町安塚の島田武七郎が 1877 年に第一回内国勸業博覧会に出品したことによる。このことが栃木県のかんぴょうの評価を高め、需要も増加し、ユウガオの作付けが県内各地に拡大した。

江戸時代から明治時代の生産状況は明らかでないが、1907 年には作付面積が 989ha、1041t の生産量であった。昭和 10 年代には 3000ha 以上の作付けが続いた（農山漁村文化協会 1989）。近年では、1978 年の 3040ha をピークとして、生産者の高齢化、輸入量の増大、食生活の変化による消費の減少等により減少し 1999 年には作付面積は 349ha となった（栃木県 2001）。

ユウガオは 3 月下旬から 4 月上旬に育苗ポット等に播種する。発芽適温は 25 ～ 28 ℃ であるので、ビニル被覆したトンネル内で電熱線等を用いて温度を確保する。定植地は肥沃で排水性の良い圃場を選定し、地温が 15 ℃以上になる 5 月上旬以降に定植する。栽植距離は畦幅 6m、株間 2 ～ 2.5m とし、10a 当たりの施肥量は、堆肥 2t、苦土炭カル 100kg、窒素 20 ～ 25kg、リン酸 25 ～ 30kg、カリ 20 ～ 25kg が標準である。生育中、親づるを 5 ～ 6 枚で摘心し、子づるを 2 ～ 3 本伸ばして誘引する。生育初期に敷きわらを行い、さらに、6 月中旬に追肥・耕起した後、直ちに全面に再度敷きわらを行う。ユウガオの開花は日没後で、通常、ヤガ、スズメガ等により交配が行われるが、7 月上旬まではこれらの訪花昆虫が少ないので、初期の着花時には必ず人工交配（花合わせ）を行う。収穫適期は開花後 15 ～ 20 日で果実が 5 ～ 7kg になった頃である。

栃木県ではかんぴょうは重要な特産品であることから、1928 年頃からユウガオの品種育成が開始された。その途中、第 2 次世界大戦により一時中止となり、さらに、1945 年の戦災により保存された品種や改良された系統が消滅し、それまでの業績は不明である。育種方法は在来優良品種を県内から収集し、これらからの純系分離が主であった。戦後もこの方法により育種を継続し、1956 年に品種しもつけしろ、しもつけあおを育成した。1958 年頃からは一代雑種利用による品種育成を試みたが成果は得られなかった（中山 1962）。1959 年以降は耐病性品種育成を目的に東南アジアを中心に広くユウガオ属を収集し、遠縁交雑を行った。その後は交雑育種が中心となり、しもつけ晩生（小熊・藤平 1979）、ゆう太（高野ら 1992）を育成した。しかし、生産の急激な減少によりユウガオの品種育成は縮小の方向にある。現在、育成を担当している栃木分場では、育成品種、在来種その他、日本国内を始め海外から収集した 150 を超える品種等を維持・保存している。しかし、労力や予算の縮小にともない大きな負担となってきた。

ウリ科のユウガオ属に属しているユウガオを、牧野（1989）はユウガオ（*Lagenaria siceraria* (Molina) Standley var. *hispida* (Thunb. ex Murray) Hara), その変種であるヒョウタン（*L. siceraria* (Molina) Standley var. *gourda* (Ser.) Hara), フクベ（*L. siceraria* (Molina) Standley var. *depressa* (Ser.) Hara）に分類している。さらに、フクベは栃木県で栽培されており、かんぴょうと呼ばれていると記載している。しかし現在では、ユウガオの果皮の部分を乾燥させたものを材料として作られた工芸品をフクベ細工と呼び、それ以外ではフクベと表現する例はほとんど無く、我が国で唯一品種育成を実施している栃木県農業試験場栃木分場においてもユウガオ（第 14 図）とヒョウタン（第 15 図）の 2 つに分類している。これらの品種分類についての研究はほとんど無く、中山（1962）が国内外から収集したフクベ類については果形と用途等で、栃木県内のかんぴょう品種については果型、果色、蔓の太さ等により数種類に分類しているのみである。ユウガオは他殖性植物であるが、同分場においては品種育成の母本として自殖により維持している。遺伝的に完全には固定しておらず、まれに表現型に年次間で変異のみられる品種も



第 1 4 図 代表的なユウガオの果実



第 1 5 図 代表的なヒョウタンの果実

ある。また、保存品種にはヒョウタンも多く含まれている。これらのことから、外観のみによる品種の特定、分類、純度維持が非常に困難であり、より正確で合理的な手法が必要である。

分子生物学の急激な進歩にともない、DNA マーカーを利用した品種識別が他作物では今まで述べてきたように盛んに行われている。水稻では大坪ら（1999, 2002）や小笠原・高橋（2000）が、ムギ類では内村ら（2004a）が品種識別のための DNA マーカーを開発している。RAPD 分析を用いた分類については、ペレニアルライグラスについて山下ら（1996）が、ヤムイモについて林ら（2001）が行っているが、ユウガオについて分類した例はまだ無く、Decker-Walters ら（2001）が世界各国のヒョウタン（*L. siceraria*; Cucurbitaceae）について RAPD マーカーを用いて多様性の評価をしているのみである。

本章では、栃木分場のユウガオおよびヒョウタン品種を維持保存する際の参考とするため、RAPD マーカーを用いて多型を検出した。また、そのデータをもとに品種を分類するため、ユークリッド距離を用いたクラスター分析を試みた。

## 1. RAPD 分析による品種分類

本節では、栃木分場のユウガオおよびヒョウタン品種を維持保存する際の参考とするため、その一部について RAPD マーカーを用いて多型を検出した。

## 材料と方法

### (1) 供試品種

栃木県農業試験場栃木分場で保存しているユウガオ 14 品種とヒョウタン 10 品種、計 24 品種を供試した。これらの由来、茎の太さ、果実の形・色、ユウガオとヒョウタンの分類について第 15 表に示した。これらのデータは、同分場の保存台帳と 1989 ～ 1999 年の野菜試験成績書から抜粋し取りまとめた。分類は同栃木分場が独自に行ったものである。

第15表 ユウガオ供試材料の来歴と特性.

品 種 名	来歴 (または両親)	形態的特性			分類
		茎の太さ	果実の形	果実の色	
しもつけ晩生	しもつけあお//しもつけしろ/T. 143	中	洋梨	白	ユウガオ
しもつけしろ	在来種から純系分離	中	短洋梨～洋梨	白	ユウガオ
しもつけあお	在来種から純系分離	中	短洋梨～洋梨	緑	ユウガオ
ゆう太	しもつけあお/小山在来	太～中	長洋梨～洋梨	白	ユウガオ
野州7号	ゆう太/スイス (センター)	太	長洋梨	白	ユウガオ
小金井在来	県内から収集	中～やや細	洋梨～短洋梨	白	ユウガオ
小山在来	県内から収集	中～やや細	短洋梨～洋梨	白	ユウガオ
二宮在来	県内から収集	やや細	洋梨	緑→白	ユウガオ
上三川在来青	県内から収集	中～やや細	短洋梨～洋梨	緑	ユウガオ
かわちしろ	県内種苗会社から購入	やや細	洋梨	白	ユウガオ
岡山在来	岡山県和郡佐伯町(1966)	やや細～中	洋梨～長洋梨	白	ユウガオ
印度かんぴょう (広島)	不明	やや細	短洋梨～洋梨	白	ユウガオ
スイス(センター)	不明	中～やや細	洋梨～球	白	ユウガオ
マニラ野生種	不明	やや細～中	丸→瓶～円筒	白	ユウガオ
ヒョウタン18	青瓢箪/白長(ヒョウタン、苦み無)	やや細～中	丸→長洋梨～瓶	緑→白縦かすり	ヒョウタン
大長ひょうたん岐阜3	岐阜県から導入	中	長瓢箪～鶴首	白	ヒョウタン
極小千成	不明	細	瓢箪	白	ヒョウタン
中ひょうたんA	県内から収集収集したと推測	やや細	瓢箪	白	ヒョウタン
大ひょうたんA	県内から収集収集したと推測	やや細	瓢箪	白	ヒョウタン
特大ひょうたん	不明	やや細	瓢箪	白	ヒョウタン
長杓ひょうたん	不明	やや細	鶴首	中	ヒョウタン
イボ瓢箪	不明	やや細	扁珠	緑	ヒョウタン
マダガスカル	不明	やや細	円筒	緑	ヒョウタン
URUGUAI産	不明	中	瓢箪	緑	ヒョウタン

主に栃木分場所所有のユウガオ保存台帳と1989～1999年野菜試験成績書を参考にして取りまとめた.

特性中の矢印は保存台帳と成績書で異なることを示す.

特性中の波線は成績書の年次間差を示す.

各品種は自殖またはきょうだい交配で維持してはいるが、他殖性であることから、各品種 8 個体を用い品種内の変異も見ようとした。

## (2) DNA の抽出

ポットに栽培した株の第 4 ～ 5 葉の生葉身 0.1g から MagExtractor<sup>®</sup>-Plant Genome-DNA 抽出キット（東洋紡績株式会社），および同社製自動核酸抽出装置（MFX - 2000）を用いて抽出を行った。

## (3) RAPD 分析による多型検出

抽出した DNA は 1 / 10TE バッファーを用いて 5ng /  $\mu$  L に調製し、鋳型 DNA 量として 1  $\mu$  L 使用した。PCR 反応液はランダムプライマー 6pmol, dNTP 混合液 2.5 mM（タカラバイオ社），反応バッファー（タカラバイオ社）を 1.25  $\mu$  L および rTaq（タカラバイオ社）0.5 unit に滅菌蒸留水を加え 12  $\mu$  L とした。PCR 増幅は、サーマルサイクラー DNA Engine Tetrad PTC - 225（MJ Japan 社）を用い、同じウリ科のメロンで Fukino ら（2002）が用いた Nunome ら（2001）の方法を改変し、熱変性を 94℃で 1 分間行った後、94℃で 30 秒、アニーリングを 45℃で 1 分 30 秒間、72℃で 2 分間を 1 サイクルとして 45 サイクル行い、伸長反応を 72℃で 5 分間行った。増幅した DNA は 1.5 %アガロースゲルを用い 100 V の電圧で約 100 分間の電気泳動を行った。電気泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイド溶液で 20 分間染色後、デンストグラフ AE - 6920 - FX（アトー社）を用い PCR 増幅産物を確認し、バンドの有無により DNA 多型を検出した。

プライマーは、Decker-Walters ら（2001）を参考に 44 種類を供試した。

## 結 果

供試した 45 プライマーの内、OPO19, OPAQ3, OPAT2, OPAU16 の 4 プライマーで増幅が見られなかった。残り 41 プライマーで合計 309 バンドが検出できたが、バンドが薄くかつ個体間で不規則に現れた 134 バンドは解析不能と判断しデータから除外し

(第 16 図), 144 バンドでは多型が得られなかった. DNA 多型が認められたのは 21 プライマーで 31 バンドあり, これらを分類のための DNA マーカーとした (第 17 図, 第 16 表).

特大ひょうたん, 長杓ひょうたん, イボ瓢箪, URUGUAI 産では同一品種内の 8 個体間で変異が検出され, これら品種でヘテロ接合性が残っていると推定された. それら以外は品種個体間の変異はなかった. DNA マーカーは OPF4, OPW7, OPAQ13, OPAS14, OPAV11, および OPAX16 で分離した (第 17 図). 品種別に見ると, 特大ひょうたんで 1 マーカー, 長杓ひょうたん, イボ瓢箪で 2 マーカー, URUGUAI 産で 5 マーカーであった. DNA マーカー別にみると OPF4 の 500bp, 同 550bp, OPW7 の 650bp, OPAQ13 の 2400bp, OPAV11 の 1700bp および OPAX16 の 1000bp で 1 品種に, OPAS14 の 1000bp で 4 品種に見られた.

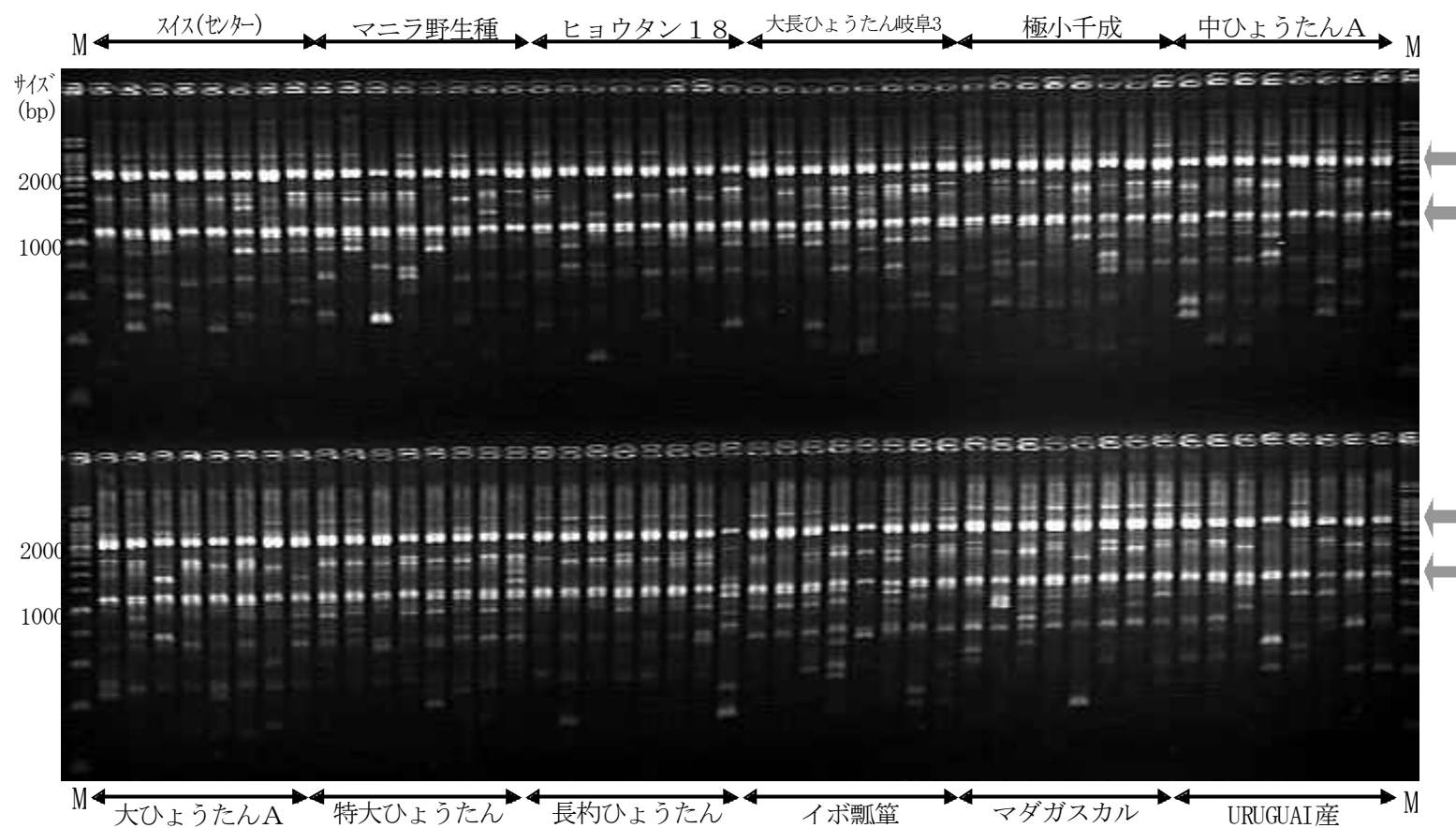
栃木県内のユウガオ 10 品種間に多型の現れたマーカーは 4 種類, OPL3, OPL18, OPU15, OPY3 であった. 国内産と推測されるユウガオ 12 品種間では 8 マーカーで多型が現れた. ユウガオ 14 品種間のみに多型の現れた DNA マーカーは 11 種類であった.

マダガスカルに特異的な DNA マーカーとして, プライマー OPK7 で 800bp, OPL18 で 2200bp, OPN8 で 1250bp, OPU15 で 2800bp, OPAF7 で 2000bp, OPAH1 で 1500bp にポジティブに現れる 6 種類と, OPAQ13 で 2400bp に現れないネガティブな 1 種類が得られた. また, イボ瓢箪では, OPU15 で 2400bp にポジティブな, OPC7 で 2000bp にネガティブな特異的 DNA マーカーが得られた (第 16 表).

以上の結果, 特に, 県内由来の品種間での多型は少なかった. 一方, イボ瓢箪, URUGUAI 産およびマダガスカルでは多型が多くみられた.

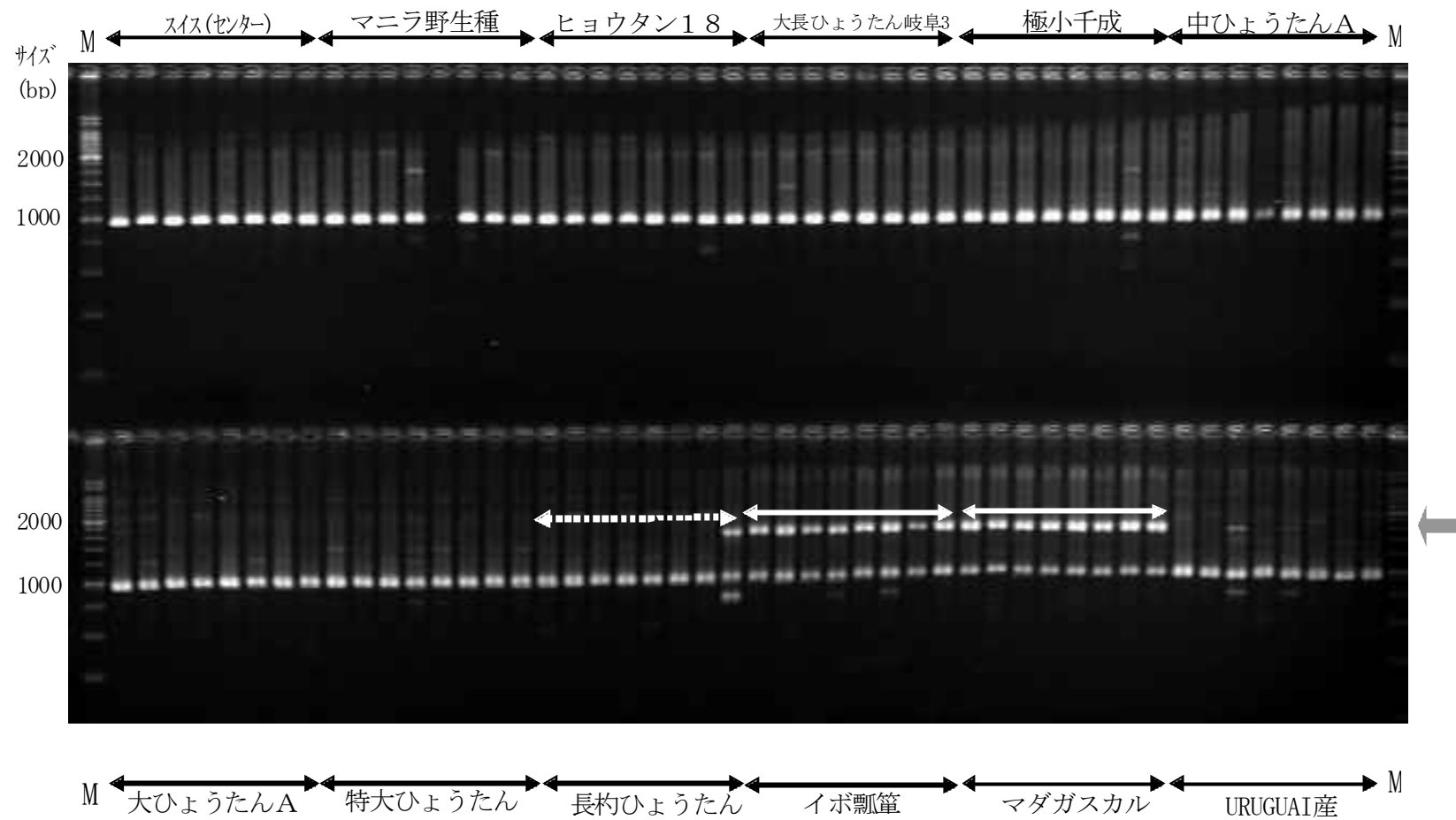
## 考 察

ユウガオは栃木県の特産作物であり全国の 90 %以上のシェアを占める. 現在, 栃木県農業試験場栃木分場で育種を行っているが, 近年の急激な作付けの減少から収束の方向に



第16図 プライマーOPW3を用いて得られたユウガオのDNA多型.  
矢印のバンドは多型無しと判定.  
その他のバンドは判定不能とした.  
Mは200bp DNA ladder.





第17図 プライマーOPAV113を用いて得られたユウガオのDNA多型.  
 図中の実線の矢印は品種内で分離無し, 点線の矢印は分離している品種.  
 Mは200bp DNA ladder.

第 1 6 表 RAPD分析によるユウガオのDNA多型.

プライマー名 品 種 名	C7	F4		J7	K7	L3		L4	L18				M7	N8	U15				W7	Y3	AA19	AC11	AD12	AF7	AH1		AQ13	AS14		AV11	AX16
マーカー長 (bp)	2000	550	500	800	800	410	810	1700	800	1200	1700	2200	500	1250	780	1700	2400	2800	650	300	820	600	1210	2000	450	1500	2400	1000	2200	1700	1000
しもつけ晩生	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
しもつけしろ	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
しもつけあお	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
ゆう太	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
野州 7 号	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
小金井在来	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
小山在来	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
二宮在来	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
上三川在来青	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
かわちしろ	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
岡山在来	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
印度かんぴょう(広島)	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
スイス(セター)	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
マニラ野生種	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
ヒョウタン 1 8	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
大長ひょうたん岐阜 3	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
極小千成	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
中ひょうたんA	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
大ひょうたんA	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
特大ひょうたん	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	seg.	1	0	1
長杓ひょうたん	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	seg.	1	seg.	0
イボ瓢箪	0	0	seg.	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	seg.	0	1	0
マダガスカル	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
URUGUAI産	1	seg.	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	seg.	1	1	1	1	0	0	0	seg.	seg.	1	0	seg.

多型の現れたDNAマーカーの有無を0 (1品種8個体全てにバンド無し), 1 (1品種8個体全てにバンド有り), seg. (1品種8個体間で分離) で示す.  
 プライマー名の頭文字OPは共通なので, 省略して記載した.  
 図中央部, 点線より上をユウガオ, 下をヒョウタンと分類した.

向かうことが検討されている。このことは、現在保有している有用な遺伝資源としての保存品種の維持も難しいことを意味している。しかし、これらの遺伝資源は極めて貴重であることから特性等を評価し、必要最小限の品種は保存していく必要がある。その一手法として DNA マーカーを用いた分類とカタログ化が有効な手段と考えられる。そこで、開発にコストがかからず簡易に DNA マーカー検索が可能な RAPD 分析を用いて同栃木分場で育種母本として有望としている中から 24 品種を供試し分類を試みた。

Decker-Walters ら (2001) は、45 プライマーを用いて 64 種類の DNA マーカーを得ている。それらのマーカーを利用して世界各国から収集したヒョウタンの 75 品種が識別できるとしている。今回の結果では、31 マーカーが得られたが、多くは導入品種由来特異的 DNA マーカーであり、栃木県由来の 10 品種間で得られたのは 4 マーカーのみであった。国内産と推測されるユウガオ 12 品種間でも 8 マーカーのみであり、ユウガオに関しては、近縁関係が極めて近いと考えられた。

系譜が明らかとなっている栃木県育成品種では、しもつけしろを母に、タイから導入した T.143 を父に交配を行い、その雑種第 1 代を父としてしもつけあおを母とするしもつけ晩生（小熊・藤平 1979）は小金井在来と同じ多型を示した。しもつけあおを母に、小山在来を父に用いたゆう太（高野ら 1992）は両親および二宮在来、ヒョウタン 18 と同じ多型を示した。以上のように、県育成の品種は、一部で系譜と DNA マーカーに関係が示唆されたが、最大で 4 種類の DNA マーカーで多型がみられたのみであることから、このデータにより分類することは危険であると判断した。

ヒョウタン 18 が栃木県由来品種と同じ多型を示したが、保存台帳と最近の試験成績での特性調査での果形が異なることから、混種または、自然交雑等、なんらかの原因により従来の品種とは異なる可能性が高いと推定され、材料として不適切であった可能性が高い。

以上の結果から、栃木県内由来の品種については近縁関係が極めて近く、DNA マーカーによる分類は困難であると推定された。これは、栃木県のユウガオは主に滋賀県から取り寄せたものに由来し、栃木県の気象条件等に適した品種が選抜されてきたことと一致す

る（農山漁村文化協会 1989）.

今後も同分場が現在の規模で品種を維持していくのは非常に困難な状況にある．また，今回供試した品種の中には導入当時と特性が異なっているものがある．中山（1962）がしもつけしろを育成する際，自殖弱勢を回避するため，約 7 年間の自家交配の後，系統群間の交配を行ったとあり，自殖による弱勢の影響も推察される．また，混種または，自然交雑等が原因とも推察される．このように，数年に 1 回とはいえども，植物体が大きくなるユウガオをきょうだい交配することは多くの労力が必要となる．

そこで，今までの調査成績を基に表現型の特性，耐病性等で分類し，代表的な品種を残すことにより必要最少限の遺伝資源が維持・保存できると思われる．また，RAPD マーカーについてはより多くの DNA マーカーの検索と，それらを用いた効率的な分類を可能にするため，水稻で大坪ら（2002），イチゴで田崎ら（2004）が行っているように STS 化を図る必要がある．

## 2. ユウガオのクラスター分析による分類

前節の RAPD 分析によるユウガオの品種分類の結果，栃木県内由来の品種については近縁関係が極めて近く，DNA マーカーによる分類は困難であると推定された．しかし，それ以外の品種について判然としていない．一方，Decker-Walters ら（2001）は，アジア産とアフリカ産ヒョウタンが遠くに位置し，新大陸の品種は両方のクラスターに位置しているとしている．そこで，本節では類縁関係が視覚的に捉えられるクラスター分析を行った．

## 材料と方法

### (1) 供試品種

前節の RAPD 分析によるユウガオの品種分類で得られた DNA マーカーを用いた（第 15 表，第 16 表）.

## (2) クラスター分析

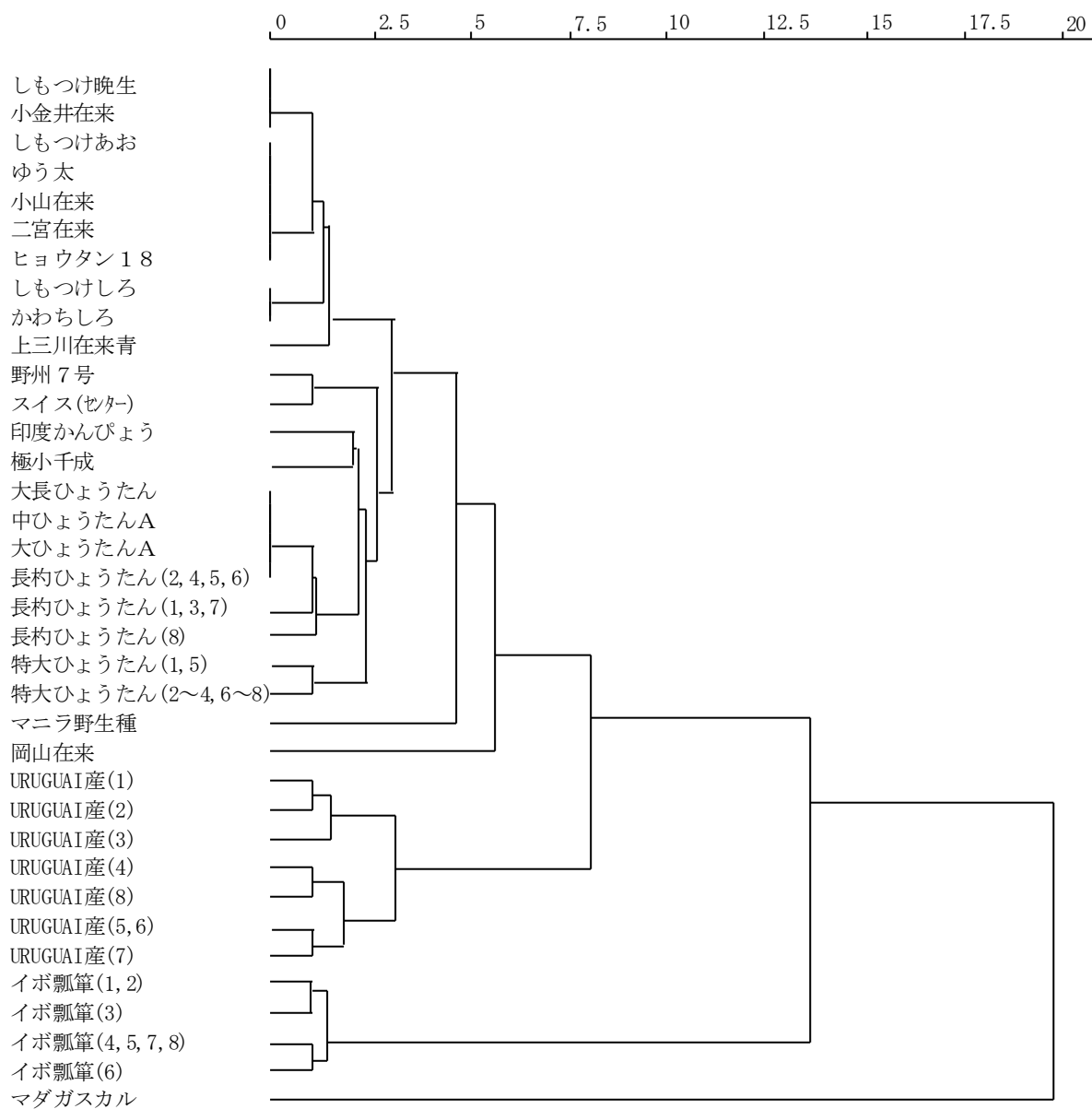
品種の個体別に DNA 多型のデータを用いてクラスター分析を行い，個体間の距離をデンドログラムにより視覚化した．RAPD マーカーにより検出した DNA 多型のデータは，PCR 増幅産物が現れた場合を‘1’，無い場合を‘0’とした．数値化した DNA 多型の全データを，そのまま青木によるプログラム（注：<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/Mokuji/index2.html>）に入力し，正規化せずユークリッド距離を求め，群平均法（UPGMA）によるクラスター分析を行った．

## 結 果

31 種類のマーカー（第 16 表）より計算したクラスター分析の結果として得られたデンドログラムを第 18 図に示した．その結果，大きく 4 つのクラスターに分類された．ほとんどの品種が含まれるクラスター，URUGUAI 産，イボ瓢箪，マダガスカルのみで形成されるクラスターとなった．1 品種 8 個体を供試したが，ほとんどの品種は個体間に多型がみられず同一のクラスターに分類された．同一クラスターにならなかった品種も隣接したクラスターとなったことから，遺伝的な固定は不完全ではあるものの，品種内変異が品種間変異を超えることは極めて少なく，本研究での供試品種が分類できることが示された．

ユウガオは 12 品種が近くに位置したが，マニラ野生種と岡山在来は異なるクラスターを形成した．国内のヒョウタンはほとんどが隣接した．しかし，ヒョウタン 18 は栃木県由来のユウガオのクラスターに含まれた．栃木県由来ユウガオと国内から導入したヒョウタンは異なるクラスターを形成したが，大きな差ではなかった．栃木県由来のユウガオ品種から最も遠くに位置したのは，マダガスカル，次いで，イボ瓢箪，URUGUAI 産となった．

栃木県内の在来種から純系分離で育成されたしもつけあおは，ゆう太，小山在来，二宮在来，ヒョウタン 18 と同じクラスターに位置した．同様に育成されたしもつけしろは，



第18図 RAPDマーカーによる多型情報を基にしたユウガオ品種間のクラスター分析結果。  
 品種内に分離のみられた品種は個体別に分析した。  
 括弧内の数字は品種内の個体番号。

かわちしろとおなじクラスターに位置した。しもつけ晩生は、しもつけあおとしもつけしろに由来しているがそれぞれ隣接したクラスターに位置した。ゆう太は両親であるしもつけあお、小山在来と同じクラスターに位置し、野州 7 号は父親であるスイス（センター）に隣接した。

## 考 察

ユウガオは栃木県の特産作物であり、現在、栃木県農業試験場栃木分場で育種を行っているが、作付けの減少から収束の方向に向かうことが検討されており、現在保有している有用な遺伝資源としての保存品種の維持も難しい。しかし、これらの遺伝資源は極めて貴重であることから特性等を評価し、必要最小限の品種は保存していく必要がある。その一手法として DNA マーカーを用いた分類とカタログ化が有効な手段と考えられる。そこで、RAPD 分析で得られたデータを用いてクラスター分析を試みた。

系譜が明らかとなっている栃木県育成品種では、しもつけしろを母に、タイから導入した T.143 を父に交配を行い、その雑種第 1 代を父としてしもつけあおを母とするしもつけ晩生（小熊・藤平 1979）は小金井在来と同じクラスターに含まれた。しもつけあおを母に、小山在来を父に用いたゆう太（高野ら 1992）は両親および二宮在来、ヒョウタン 18 と同じクラスターに含まれた。ゆう太を母とし、スイス（センター）を父とした野州 7 号はスイス（センター）と隣接したクラスターに位置した。導入した品種を交配母本として用いているしもつけ晩生と野州 7 号が栃木県由来品種の中では、最も遠くに位置したことは興味深い。

ヒョウタン 18 が栃木県由来品種の中に位置しているが、前節で述べたように保存台帳と最近の試験成績での特性調査での果形が異なることから、なんらかの原因により従来の品種とは異なる可能性が高いと推定され、材料として不適切であった可能性が高い。海外からのヒョウタンの導入種は栃木県由来ユウガオから最も遠く位置した。アフリカ原産のマダガスカルが最も遠く、次いでイボ瓢箪、URUGUAI 産が続く。

クラスター分析の結果からも、栃木県内由来の品種については近縁関係が極めて近いことが示唆された。一方、国内の他の地方産は岡山在来のみであるが、栃木県で栽培されているユウガオと由来が異なると推察された。また、海外からの導入種については、供試品種数が少ないこともあるが、栃木県由来品種とは遠縁であることが明らかとなった。

栃木県内由来の品種については近縁関係が極めて近いことが示唆されたことから、今までの調査成績を基に表現型の特性、耐病性等で分類し、代表的な品種を残すことにより必要最小限の遺伝資源を維持・保存できると思われる。また、海外からの導入種については、アフリカ産、アジア産、および新大陸産は多様性が広いことから、現在保有している品種を数多く維持・保存することが必要であると示唆された。

いずれにしても、同栃木分場保有のユウガオ属品種は遺伝資源として極めて貴重な財産である。できるだけ多くの品種を保存する努力をする一方で、新たな保存機関を早急に探していく必要がある。

## まとめ

ユウガオを育種している栃木県農業試験場栃木分場の保存品種について、維持保存の参考とするため、栃木県育成品種 5 品種を含むユウガオ 14 品種とヒョウタン 10 品種、合計 24 品種について RAPD 分析とクラスター分析を用いて分類を試みた。44 種類のランダムプライマーを用いて 31 種類の DNA マーカーが得られた。その内、栃木県由来の品種間では 4 種類の多型がみられたのみであり、近縁関係が極めて近いと示唆された。県外や海外からの導入品種は近縁関係が遠いことが示唆された。これらのことから、今後も保存品種を維持するにあたり、県内品種については表現型で分類し代表的な品種を、導入品種については広い地域からの品種を数多く保存することが望ましい、との提言ができた。



## 第6章 総合考察

栃木県における水稻およびムギ類は本県農業の基幹作物となっている。そこで、栃木県では需要動向に応じた作付誘導、品質向上対策および優良品種の導入を図っている。これら水稻やムギ類の品種数の増加は原々種や原種生産において作業の煩雑さの増加を伴い混種・取り違えの危険性が高まる。一方で、近年消費者の安全性に対する関心や健康志向の高まりにより農林物資の規格化および品質表示の適正化に関する法律が改正され、品質表示基準制度が充実・強化された。これらの情勢から今後、水稻やムギ類の簡便で正確な品種識別技術に対する要望は高まってくると考えられる。従来、品種の識別は形態や生理特性等で行ってきたが、この方法では気象条件や栽培方法等が結果を大きく左右し、識別が困難となる場合がある。これらの影響を受けない DNA マーカーの利用は品種識別にとって極めて有効である。以上の事を踏まえ、本論文では DNA マーカーの中で最も検出操作が簡便な RAPD 分析を用い、まず、栃木県の奨励品種を中心に水稻とムギ類の品種を識別できる RAPD マーカーの組合せを明らかにしようとした。

また、近年の育成品種は、高品質の品種や系統が組み合わせられ、交配母本の系譜が似通ってきており、近縁度が高まっていると推定され、今後、品種識別マーカーを開発していくうえでの支障となることが考えられる。育種においても、交配親の遺伝的背景を解析し把握しておくことは効率的な品種育成や遺伝的多様性の維持のために重要となってくる。そこで、ムギ類品種間の遺伝的関係を調査するため、ユークリッド距離を用いたクラスター分析を試みた。また、遺伝的背景を把握するため、交配親となる品種間の近縁係数や DNA マーカーを用いた遺伝的距離などの解析を試みた。

最初に、栃木県水稻優良品種を識別できる RAPD 分析によるマーカーの組合せを見出した。20 品種について、7 種類のランダムプライマーを用いて得られた 9 種類の DNA マーカーの多型を比較することで可能であった。イネ品種の識別法としては、RAPD 分析の他に RFLP 分析、SSR 分析および AFLP 分析等が実施されている。将来的に採種担当

者および農業協同組合関係者等の現場での利用を考えた場合、操作方法の簡易性および安全性を考慮する必要がある。これら現場で分析される場面は、圃場で異株が現れた場合の確認や生産物を出荷する時に限られ、季節的な分析に限られる。また、従事者は数年おきに異動があり煩雑また危険を伴う操作に習熟するのは困難な場合が多い。そこで、本論文では低コストで開発が可能で、操作が簡易で安価な RAPD 分析を採用した。

大坪ら（1997）は当初、10 品種を識別するために 600 プライマーを検討した。それに対し、本論文ではわずか 23 プライマーで 19 品種を識別できるランダムプライマーを選定できた。これは、これまでの品種識別に関する文献を参考に多型の出る可能性が高いランダムプライマーを使用したためである。今後も新しい品種が出てくる毎にこれまでの情報を有効に利用することが必要である。本論文では再現性が高く、かつ、明瞭なバンドを DNA マーカーとして選抜した。しかし、RAPD マーカーは一般的に他の DNA マーカーに比較して再現性が低いと言われている。また、不要なバンドが出て視認性が劣る。今後は大坪ら（2002）や小笠原・高橋（2000）のように STS 化し、さらに、マルチプレックス化することによって操作回数を減らし簡便化すること、また、視認性を高める必要がある。

本論文では RAPD 分析のみで識別を行ったが、今後はより近縁度の高い品種が多数開発される可能性が高く、さらに効率的に多型を検出することが必要である。そのためには、RAPD 分析だけではなく、AFLP 分析、SSR 分析等も実施する必要性が考えられる。また、イネで使用している例は少ないが、イチゴ（Kunihisa ら 2003）やオオムギ（内村ら 2004a）の品種識別に利用されている CAPS 分析や品種識別を目的とはしていないがオオムギ（Fernandez ら 2002）やイチゴ（Cekic ら 2001）で用いられている ISSR 分析も有効な手法と思われる。

ムギ類品種を識別できるマーカーも RAPD 分析のみを用いて開発した。水稻と同様に開発にコストがかからず、操作が簡易で安全かつ低コストである方法を前提とした。

プライマーについても、水稻と同様に、これまでの品種識別に関する文献を参考に多型

の出る可能性が高いランダムプライマーを使用した。その結果、28 プライマーでコムギ 17 品種、オオムギ 19 品種を識別できるランダムプライマーセットを選定できた。今後出てくる新しい品種についても、ここでの情報が有効に利用できると思われる。また、大坪ら（1997）が国内主要 10 品種を識別した時に多型の現れた 8 種類のランダムプライマーの内 5 種類、本論文でイネの品種識別マーカを開発する時に多型の現れた 12 種類の内、8 種類がムギ類でも使用できたことはイネとムギ類の場合、共通のランダムプライマーが使用できる可能性を示唆していると思われた。

本論文では RAPD 分析のみで識別を行ったが、近縁度が高まってくると品種識別は困難になってくると推察される。そこで、現在採用されているムギ類品種の遺伝的背景を確認した。クラスター分析を行ったところ、コムギでは用途の違いによって、また、育成地でクラスターが分けられる傾向が一部みられた。小麦農林 61 号は収集した県の間で多型がみられた。厳密に品種の定義を考えた場合に特性が均一であることが条件の一つであることから、原々種や原種生産の際に DNA マーカーを用いた変異のチェックも必要になってくるであろう。イネでは、コシヒカリで同様な解析が必要と考えられる。

オオムギのクラスター分析の結果では、二条オオムギと六条オオムギとに明確に分かれた。これは、二条オオムギは醸造用として、六条オオムギは精麦用として育成されていることから、遺伝的背景が異なるためと考えられる。六条オオムギの中では育成地にクラスターが分かれ、これは、やはり遺伝的背景が異なっていることに起因すると思われた。一方、二条オオムギの関東二条 35 号は、雑種第 13 代であるが系統間で多型はみられなかった。今後、固定度調査の中に今回のような DNA マーカーによるチェック体制を導入することも有効と考えられる。

品種間多型の現れたコムギおよびオオムギにおいて、同一マーカー数、遺伝的距離  $D$  および近縁係数を計算した。どの値も系譜、育成地、交配親などを良く反映し、品種間の類似性も同様の傾向を示し、クラスター分析の結果と概ね一致した。

全品種相互間での同一マーカー数と近縁係数との間には、有意な相関関係がみられた。

1 品種の組合せに限った場合の相関係数はさらに高くなった。オオムギでは X 軸に偏る傾向があり、また近縁係数が 0 でもあるにもかかわらず同一マーカー数が 6 から 20 に並んでいる場合があったが、これは二条オオムギと六条オオムギで系譜図上では同じ祖先品種が無いが、共通の祖先が実際には存在していたことを示している。

次に、近縁係数と遺伝的距離との関係も同一マーカーの場合と同様で、コムギでは全品種間で有意な相関が認められ、イワイノダイチの他品種との相関係数は最も高くなった。DNA 多型の検出率からみて遺伝的相似度が高く遺伝的距離が近いにもかかわらず交配記録による系譜上では類縁関係があまり無い傾向が認められた。これらが交配記録上では類縁関係がないが、遺伝的背景からみると共通している遺伝子領域が多いためと考えられる。オオムギの近縁係数と遺伝的距離 D との関係を見ると、全品種相互間で有意な相関が認められた。スカイゴールドと他品種との組み合わせでの相関係数を見ると、より高い値であった。オオムギの場合はコムギと異なり、DNA マーカーで推定した遺伝的距離が近いにもかかわらず、系譜上の類縁関係は近いものから遠いものまで分布していることを示した。これは、系譜上では共通祖先のない二条オオムギと六条オオムギを一緒に比較しているためと考えられる。特に、ただ 1 つ供試した裸ムギであるイチバンボシの他品種との相関係数は最も低くなっていた。このように一部の不整合性はあるにせよ、系譜上の類縁関係から計算した近縁係数は同一の DNA マーカー数や、遺伝的距離 D とコムギ、オオムギ共に有意な相関関係が認められた。これらの結果は、近縁係数が同一マーカー数や DNA マーカーから算出した遺伝的距離 D からある程度の裏付けがなされ、今回 DNA マーカーで検出した多型が存在する染色体領域は、品種育成の過程の選抜や淘汰により大きく偏ることなく、後代にほぼ均等に分離していったことを示している。さらに、不整合性のみられた品種では、その系譜の不完全性を示唆することができた。

現状では品種間の遺伝的背景の違いは近縁係数の計算で比較的簡単に推定可能であるが、今後、近縁係数が高まってくることが予想され、また、二・六条オオムギ間の交配では近縁係数が 0 でも分子マーカーで関連性が認められることがある等から分子マーカー

による同一マーカー数や遺伝的距離  $D$  の推定も重要になってくるとされる。遺伝的距離  $D$  と同一マーカー数の相関を求めた結果、コムギ、オオムギともに極めて高かった。これは、単にマーカーが同一であるかどうかを数えるのみでも、品種相互間の遺伝的な違いを推定するのに有効であることを示している。

内村ら (2004b) は二条オオムギ品種を材料とし、系譜図から計算した近縁係数と分子マーカーから推定した遺伝的距離の間に高い相関を認めている。本論文の結果も、コムギおよびオオムギでも同様に高い相関があることを明らかにした。これは、品種の系譜図が極めて正確であることも示している。以上のことから、近縁程度を求めるには DNA マーカー利用も重要であるが、近縁係数による簡易な血縁関係の推定もコムギ、オオムギともに有効であることを示している。気象変動、栽培法の改良等に対応するためにリスク分散を図るうえで、遺伝的な多様性の維持を意識しながら品種育成を実施するためにも、近縁係数のみならず、分子マーカーから算出した遺伝的距離  $D$  および同一マーカー数の有効な利用が必要と考えられた。現在、すべての育種機関で分子マーカーを利用できる体制ではないが、育種者の利便性を考慮し、上記いずれかの方法を交配計画に取り入れることにより育種の効率化が図られると思われる。

他殖性のユウガオは栃木県の特産作物であり、栃木県農業試験場栃木分場で育種を行っているが、近年の急激な作付けの減少から収束の方向に向かうことが検討されている。このことは、現在保有している保存品種の維持も難しいことを意味している。しかし、これらは遺伝資源として極めて貴重であることから早急に特性等を評価し、必要最小限の品種は保存していく必要がある。そのため、本論文では DNA マーカーを用いた分類とカタログ化を試みた。

Decker-Walters ら (2001) は、45 プライマーを用いて 64 種類の DNA マーカーを得て、世界各国から収集したヒョウタン 75 品種が識別できるとしている。今回の結果では、31 マーカーが得られたが、多くは導入品種由来特異的 DNA マーカーであり、栃木県由来の 10 品種間で得られたのは 4 マーカーのみであった。国内産と推測されるユウガオ 12

品種間でも 8 マーカーのみであり，ユウガオに関しては，近縁関係が極めて近いと考えられた。

この結果から，栃木県内由来の品種については近縁関係が極めて近く，DNA マーカーによる分類は困難であると推定された。そこで，今までの調査成績を基に表現型の特性，耐病性等で分類し，代表的な品種を残すことにより必要最小限の遺伝資源を維持・保存できると思われる。国内の他の地方産は岡山在来のみであるが，栃木県で栽培されているユウガオと由来が異なると推察された。また，海外からの導入種については，供試品種数が少ないこともあり明らかにできなかったが，アフリカ産，アジア産，および新大陸産は多様性が広いことから，現在保有している品種を数多く維持・保存することが必要であると示唆された。このように，従来，品種改良もあまり進んでおらず，遺伝的情報も不明であった作物について，DNA マーカーを利用することでより合理的な遺伝資源保存方法を明らかにすることができた。

以上のように，本研究の結果，RAPD 分析による自殖性作物である水稻，ムギ類の品種識別方法と他殖性である栃木県の地域特産作物であるユウガオとヒョウタンの品種分類方法を開発した。また，コムギ，オオムギでは品種間の近縁係数が遺伝的距離と有意な相関があることを明らかにし，より簡易な近縁関係を推定する方法として DNA 多型から算出した同一マーカー数が有効であることを明らかにした。ユウガオでは RAPD 分析により栃木県由来の品種間では近縁関係が極めて近いことを明らかにした。これらの成果は本県育成品種の権利保護と品質向上並びに原種，および原々種の混種防止，さらには二条オオムギの新品種育成技術とユウガオの品種保存に大きく寄与するものと考えられる。

## 謝 辞

本研究の遂行に当たり、水稻の品種識別に関して多大なる助言を頂きました独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所大坪研一博士、ムギ類の品種識別に関して助言を頂きました福岡県農業総合試験場内村要介博士に感謝の意を表します。また、材料の提供を頂いた茨城県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都、山梨県、長野県、静岡県、および福岡県の農業研究機関関係者に謝意を表します。

本研究の遂行に関して、終始、ご親切なる御指導御鞭撻を賜りました宇都宮大学農学部吉田智彦教授に深甚なる感謝の意と心からの敬意を表します。

なお、東京農工大学農学部平沢正教授、茨城大学農学部教授松田智明教授、宇都宮大学農学部本條均教授、同和田義春助教授には本論文の校閲を賜りました。記して心より厚く御礼申し上げます。

最後になりましたが、本研究の遂行に当たり、終始暖かい励ましを頂き、様々な形でご支援、ご協力を頂きました栃木県農業試験場生物工学部、栃木分場の皆様をはじめ、ご理解を頂きお世話になりました栃木県庁職員の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 赤木守弘 2000. DNA 多型によるイネの品種識別. 育種学研究 2:89 – 96.
- Cekic, C., N.H.Batty and M.J. Wilkinson 2001. The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. Theor. Appl. Genet. 103:540 – 546.
- Decker-Walters, D., J. Staub, A. Lopez-Sese and E. Nakata 2001. Diversity in landrace and cultivars of bottle gourd (*Lagenaria siceraria*; Cucurbitaceae) as assessed by random amplified polymorphic DNA. Genetic Resources and Crop Evolution 48:369 – 380.
- Fernandez, M.E., A.M. Figueiras and C. Benito 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theor. Appl. Genet. 104:845 – 851.
- Fukino, N., M. Taneishi, T. Saito, T. Nishijima and M. Hirai 2002. Construction of a linkage map and genetic analysis for resistance to cotton apid and powdery mildew in melon. Acta Hort. 588:283 – 286.
- 林満・志和地弘信・遠城道雄 2001. ヤムイモ (*Dioscorea* spp.) における形態的および RAPD 法による系統の分類. Kagoshima Univ. Res. Center S. Pac. Occasional Papers 34:145 – 157.
- 池田延行・山田哲也・上島脩志・石井尊生 2000. イネにおけるマイクロサテライトマーカーを利用した効率的な marker-assisted selection のための超簡単 DNA 抽出法. 育種学研究 2 (別 2):134.
- 河野いずみ・竹内善信・島野公利・佐々木卓治・矢野昌裕 2000. DNA マーカーによるイネ日本型品種間の多型検出頻度の比較. 育種学研究 2:197 – 203.



- 川島清・勝股昭一 1961. 水稻品種の純度維持に関する研究（第1報）育成種の量的形質の分離と二次選抜. 千葉県原種農場業報 2:1－16.
- 小林俊一・吉田智彦 2005 RAPD分析による栃木県水稻優良品種の品種識別. 日本作物学会紀事 74:207－211.
- 小林俊一・吉田智彦 2006a RAPD分析による栃木県を中心とした関東周辺地域のムギ類優良品種識別. 日本作物学会紀事 75:165－174.
- 小林俊一・吉田智彦 2006b 関東周辺地域のムギ類優良品種における近縁係数と分子マーカーから推定した遺伝的距離との関係. 日本作物学会紀事 75:175－181.
- 小林俊一・吉田智彦 2007 RAPD分析によるユウガオ (*Lagenaria siceraria*) の品種分類. 日本作物学会紀事印刷中.
- Kuczynska, A., P. Milczarski, M. Surma, P. Masojc and T. Adamski 2001. Genetic diversity among cultivars of spring barley revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). J.Appl.Genet. 42:43－48.
- Kunihisa, M., N. Fukino and S. Matsumoto 2003. Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) marker for identification of strawberry cultivars. Euphytica 134:209－215.
- 牧野富太郎 1989. 改訂増補牧野新日本植物圖鑑. 北隆館, 東京. 470.
- 水田一枝・佐々木昭博・吉田智彦 1996a. 近縁係数のための Prolog によるコンピュータプログラムとそのビール大麦品種の近縁関係の解析への応用. 農業情報研究 5:19－28.
- 水田一枝・吉田智彦 1996b. 小麦品種の近縁係数およびその品質との関係. 農業情報研究 5:57－67.
- 森一幸・小村国則・保坂和良 2003. 1分間DNA抽出法を用いたバレイショ育種におけるDNAマーカー選抜. 育種学研究 5(別2):191.
- 森真理・宮村弘明・渡辺健三 2001. 滋賀県における水稻主要栽培品種の RAPD 法による品種の判別. 近畿中国農研 101:16－19.

- Murray, M.G. and W.F. Thompson 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321 – 4325.
- 中山保 1962. かんぴょうについての研究. 栃木農試南河内分場特別研報 2:1 – 34.
- 根井正利 2002. 分子進化遺伝学. 五條堀高・斉藤成也訳. 培風館, 東京. 1 – 433.
- 西尾小作・中川元興・牛腸英夫・渡辺進二 1973. 採種地を異にする小麦農林 61 号の主要形質の差異について. 東海近畿農試研報 25:98 – 126.
- 農業技術協会 2003. 水陸稲・麦類・大豆奨励品種特性表. 農林水産省生産局編. 5 – 306.
- 農山漁村文化協会編 1989. 全国の伝承江戸時代 人づくり風土記 9. 農山漁村文化協会. 東京. 121 – 123.
- Nunome, T., K. Ishiguro, T. Yoshida and M. Hirai 2001. Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on RAPD and AFLP markers. *Breed. Sci.* 51:19 – 26.
- 小笠原博信・高橋砂織 2000. STS-PCR 法によるあきたこまち等の 1 粒品種判別. 食科工 47:632 – 637.
- 小熊純一・藤平利夫 1979. ユウガオの炭そ病耐病性品種「しもつけ晩生」について. 栃木農試研報 25:27 – 32.
- 奥野忠一・久米均・芳賀敏郎・吉澤正 1971. 多変量解析法. 日科技連, 東京. 391 – 411.
- 奥野忠一・芳賀敏郎・矢島敬二・奥野智恵子・梨本茂司・古河陽子 1976. 続多変量解析法. 日科技連, 東京. 207 – 237.
- 大坪研一・藤井剛・橋野陽一・豊島英親・岡留博司・中村澄子・川崎信二 1997. RAPD 法を用いた国内産精米の品種判別技術. 食科工 44:386 – 390.
- 大坪研一・中村澄子・今村太郎 2002. 米の PCR 品種判別におけるコシヒカリ用判別プライマーセットの開発. 農化 76:388 – 397.
- 大里久美・吉田智彦 1996. イネ育成系統の近縁係数およびその食味との関係. 育雑

46:295 – 301.

大谷和彦・小島隆・佐藤恭子・大久保堯司・伊藤浩・五月女敏範・古田土通・藤井敏男・

栃木喜八郎・小林俊一 1996. 水稻品種「晴れすがた」の育成. 栃木農試研報 44:1 – 14.

酒井寛一 1957. 植物育種法に関する理論的研究 V. 自殖性作物の育種における近縁係数の応用. 育種 7:87 – 92.

Smile, M., M.P. Reynolds, M. Warburton, B. Skovmand, R. Trethowan, R.P. Singh, I.

Ortiz-Monasterio and J. Crossa 2002. Dimensions of diversity in modern spring bread wheat in developing countries from 1965. Crop Sci. 42:1766 – 1779.

高野邦治・長修・川里宏・赤木博・田村恭志・田口章一 1992. ユウガオ新品種「ゆう太」について. 栃木農試研報 39:95 – 102.

谷口義則・小田俊介・常見譲史・大塚勝・関和孝博・糸川晃伸・山口昌宏・五月女敏範・

福田暎・早乙女和彦・河田尚之・石川直幸・加藤常夫・加島典子・宮川三郎・神永明・小玉雅晴・佐々木昭博・仲田聡・徳江紀子・桐生光弘・野沢清一・佐藤圭一・伊藤浩 2001. 二条大麦品種「スカイゴールデン」の育成（二条大麦農林 20 号）. 栃木農試研報 50:1 – 18.

田崎公久・柏谷祐樹・小林俊一・生井潔・酒井美幸・天谷正行 2004. RAPD および AFLP によるイチゴ品種「とちおとめ」および「とちひめ」識別マーカーの選抜. 育種学研究 6 (別 2):357.

栃木県 2001. とちぎの地域特産物取組事例集. 24 – 26.

栃木県農務部 2003. 平成 16 年産麦作推進資料. 1 – 39.

栃木県農務部 2004a. 平成 16 年度稲作推進資料. 1 – 69.

栃木県農務部 2004b. 平成 17 年産麦作推進資料. 1 – 18.

栃木県 2006. 平成 17 年度首都圏農業推進計画 21. 42 – 43.

Turuspekov, Y., K. Nakamura, R. Yoshikawa and R. Tuberosa 2001. Genetic diversity

of Japanese barley cultivars based on SSR analysis. Breed.Sci. 51:211 – 213.

内村要介・古庄雅彦・吉田智彦 2004a. 国内二条オオムギの DNA マーカーによる品種識別. 日作紀 73:35 – 41.

内村要介・古庄雅彦・吉田智彦 2004b. 二条オオムギ品種における近縁係数と分子マーカーから推定した遺伝距離との関係. 日作紀 73:410 – 415.

山下雅幸・佐藤英樹・澤田均・山田敏彦 1996. RAPD 分析によるペレニアルライグラスエコタイプ集団の多型解析. 日草誌 42 (別):72 – 73.

吉田智彦 1999. 最終祖先間に類縁関係がある場合の近縁係数の変化—現行作物品種を例にして—. 農業情報研究 7:97 – 104.

吉田智彦 2004. Windows による作物品種の家系分析用 Prolog プログラムの作成. 日作関東支報 19:54 – 55.

吉橋忠・中村澄子・藤井剛・川崎信二・大坪研一 1999. RAPD 法による精米 1 粒からの品種判別技術. 食科工 46:250 – 254.

**Studies on the Identification of Main and Special Product Crops Cultivars  
in Tochigi Prefecture by DNA Markers  
and the Conservation and the Use of Genetic Resources**

**Shun-ichi Kobayashi**

**Summary**

The objective of this study was to establish the technology to identify paddy rice, wheat, barley and bottle gourd cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis to raise the quality of seed, to prevent seed contamination in the foundation seed and the stock seed and to preserve the genetic resources in Tochigi prefecture.

A total of 20 paddy rice cultivars, including 9 recommended and promising cultivars in Tochigi prefecture, were studied. They could be identified individually by the electrophoresis of the DNA fragments amplified by PCR using 7 random primers, on 1.5 % agarose gels and by staining with ethidium bromide.

A total of 17 wheat and 19 barley cultivars in the Kanto region were examined. Wheat cultivars could be identified individually by RAPD analysis using 5 random primers, followed by the electrophoresis of the DNA fragments on 1.5 % agarose gels and staining with ethidium bromide. Barley cultivars could be identified individually

by RAPD analysis using 6 random primers. A polymorphism was observed among stock seeds collected from various areas in the old wheat cultivar, Norin 61, that was bred in 1945. No polymorphism was observed among  $F_{13}$  pedigrees of two-rowed barley, Kanto Nijo 35, showing that it was fixed.

In breeding, understanding of the genetic background is effective for efficient improvement. The coefficients of parentage between the main cultivars of wheat and between those of barley were calculated based on their pedigree record. The number of same DNA markers in RAPD analysis and Nei's genetic distance between these cultivars were also calculated. The correlation between the coefficient of parentage and the number of the same DNA markers was  $0.581 \sim 0.904$  in wheat and  $0.731 \sim 0.805$  in barley. The correlation between the coefficient parentage and Nei's genetic distance was  $-0.511 \sim -0.892$  in wheat and  $-0.659 \sim -0.770$  in barley. These results show that the genetic codes detected by the molecular markers were nearly equally distributed to the offspring in the breeding process in wheat and barley. The results also show that although the DNA markers in RAPD analysis are useful, the rapid estimate of kinship by the coefficient of parentage is still effective. The number of the same DNA markers in RAPD analysis was highly correlated with Nei's genetic distance.

Bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) varieties were classified by RAPD analysis and cluster analysis to preserve them effectively. A total 24 bottle gourd varieties including 5 varieties bred by Tochigi prefecture were analyzed. Forty-four primers produced 31 scoreble, variable RAPD markers within bottle gourd varieties. Only 4 polymorphic markers were produced in 10 varieties derived from Tochigi prefecture. It suggests that the relationship between these 10 varieties is close. The relationship between these and introduced varieties was far. For preservation, the varieties

derived from Tochigi prefecture should be selected by the phenotype. Introduced varieties has to be preserved for those from wide origin.